



Étude de la production de peptides non-ribosomiques chez des souches de *Paenibacillus*

Fatoumata Tambadou

► To cite this version:

Fatoumata Tambadou. Étude de la production de peptides non-ribosomiques chez des souches de *Paenibacillus*. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2014. Français. NNT : 2014LAROS019 . tel-01205725

HAL Id: tel-01205725

<https://theses.hal.science/tel-01205725>

Submitted on 27 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

UFR SCIENCES

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

Discipline : Biotechnologies Animales, Végétales et Microbiennes

Présentée et soutenue par

M^{lle} Tambadou Fatoumata

Le 26 septembre 2014

**Étude de la production de peptides non-ribosomiques
chez des souches de *Paenibacillus***

Jury :

Djamel Drider	Pr, ProBioGem/Polytech, Lille 1	Rapporteur
Jean-Luc Pernodet	Dir CNRS, IGM, Paris Sud	Rapporteur
William Couet	Pr-PH-Dir INSERM, Poitiers	Examineur
Mohamed Marahiel	Pr, Université de Marburg, Allemagne	Examineur
Ingrid Fruitier-Arnaudin	McU-HDR, UMR-CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle	Présidente
Valérie Thiéry	Pr, UMR-CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle	Dir. Thèse
Romain Chevrot	McU, UMR-CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle	Dir. Thèse

Travaux réalisés au **Laboratoire Littoral, ENvironnement et Sociétés (LIENSs)**

UMR 7266 CNRS – Université de La Rochelle

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

UFR SCIENCES

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

Discipline : Biotechnologies Animales, Végétales et Microbiennes

Présentée et soutenue par

M^{lle} Tambadou Fatoumata

Le 26 septembre 2014

**Étude de la production de peptides non-ribosomiques
chez des souches de *Paenibacillus***

Jury :

Djamel Drider	Pr, ProBioGem/Polytech, Lille 1	Rapporteur
Jean-Luc Pernodet	Dir CNRS, IGM, Paris Sud	Rapporteur
William Couet	Pr-PH-Dir INSERM, Poitiers	Examineur
Mohamed Marahiel	Pr, Université de Marburg, Allemagne	Examineur
Ingrid Fruitier-Arnaudin	McU-HDR, UMR-CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle	Présidente
Valérie Thiéry	Pr, UMR-CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle	Dir. Thèse
Romain Chevrot	McU, UMR-CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle	Dir. Thèse

Travaux réalisés au **Laboratoire Littoral, ENvironnement et Sociétés (LIENSs)**

UMR 7266 CNRS – Université de La Rochelle

Ce travail a été financé par l'association Vaincre la Mucoviscidose.

REMERCIEMENTS :

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Pierre Richard qui m'a accueilli au sein de l'UMR-CNRS LIENSs 7266 (LIttoral ENvironnement et Sociétés), et à Messieurs les Professeurs Paco Bustamante et Olivier De Viron qui lui ont tour à tour succédés.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma Directrice de thèse, Madame le Professeur Valérie Thiéry ainsi qu'à mon Co-directeur de thèse Monsieur Romain Chevrot. Merci pour vos conseils, votre soutien, votre esprit critique et votre disponibilité durant ces trois années.

J'exprime également toute ma reconnaissance à mes encadrants scientifiques Monsieur Cyrille Barthélémy et Madame Sandrine Didelot pour leurs conseils et leur disponibilité qui m'ont été très utiles pour mener à bien ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Djamel Drider, Professeur à l'Université de Lille 1 d'avoir accepté d'assumer la fonction de rapporteur de cette thèse. Je le remercie également pour son soutien et ses précieux conseils.

Je souhaite remercier Monsieur Jean-Luc Pernodet, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut de Génétique et Microbiologie (Paris Sud) d'avoir accepté d'assumer la fonction de rapporteur de cette thèse. Je le remercie également pour ses précieux conseils pour la mutagenèse et pour l'envoi de matériel biologique.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Mohamed Marahiel, Professeur à l'Université de Marburg (Allemagne) pour ses conseils, sa disponibilité et pour l'envoi de matériel biologique.

Je souhaite remercier notre directrice d'équipe, Madame Ingrid Fruitier-Arnaudin (Maître de conférences, HDR, UMR-CNRS LIENSs, La Rochelle) et Messieurs Mohamed Marahiel (Professeur, Université de Marburg) et William Couet (Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Directeur de recherche, INSERM, Poitiers) pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse des remerciements particuliers aux personnes qui m'ont aidé lors de cette thèse :

Messieurs Nicolas Bridiau, Antoine Bonnet et Madame Anne-Laure Gagez (Les Experts La Rochelle) qui m'ont aidé pour la spectrométrie de masse. Je leur adresse mes plus sincères remerciements.

Merci à Claire Louault-Guin et Graziello Geneau pour votre bonne humeur, votre amitié et votre présence durant ces trois années.

Je remercie l'ensemble du personnel technique et administratif de l'université et du laboratoire Marie-Curie : Véronique Vézien, Corinne Coitoux, Aynur Kilic, Valérie Sopéna, Marie-Laure De Pierrefeu, Martial Safar et Viviane Biou.

Merci à Laurence Barret pour toutes ses corrections en anglais.

Un gros merci à cousin Raphaël pour ton amitié, pour les reprints de congrès et pour les nombreuses impressions de la thèse.

Je remercie Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé et Ibtissem Doghri de l'équipe DYFEA pour leurs collaborations.

Je remercie également Véronique Marguerite, Virginie Jaunet et Anna Ronayette de l'association Vaincre la Mucoviscidose pour votre soutien. Merci à vous

Je souhaite également remercier les doctorants Ibtissem Doghri, Yesmine Ben Henda, Nicolas Joguet, Moussa Mory Dhiediyou, Borris Letribot, Rachida Mersni Achour et Oussama Achour.

Ce travail doit beaucoup à l'amitié et au soutien de Donatien Mbadoumou, Farida Gounine, Dieynaba Ba, Alimatou Diatta, Margot Diop, Ibou Kane et Marie François.

Un gros merci à mon Thiof pour sa présence, sa patience, son soutien et ses encouragements.

Enfin je tiens particulièrement à remercier ma mère, mon grand frère Amadou qui a payé mes études, mon grand frère Pape, mon oncle François et mon petit frère Thierno. Merci pour votre soutien infaillible durant tout mon parcours.

Cette thèse est dédiée à ma mère et à Valérie Thiéry

VALORISATION SCIENTIFIQUE

- **Publications :**

Fatoumata Tambadou, Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé, Géraldine L. Klein, Ibtissem Doghri, Valérie Sopéna, Sandrine Didelot, Cyrille Barthélémy, Valérie Thiéry & Romain Chevrot. (2014). Novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. **FEMS Microbiol Letters** 357(2):123-30.

Romain Chevrot, Sandrine Didelot, Larissa Van den Bossche, Fatoumata Tambadou, Thibault Caradec, Pierre Marchand, Esther Izquierdo, Valérie Sopéna, Jocelyne Caillon, Cyrille Barthélémy, Ann Van Schepdael, Jos Hoogmartens & Eric Rosenfeld. (2012). A Novel Depsipeptide Produced by *Paenibacillus alvei* 32 Isolated from a Cystic fibrosis Patient. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. DOI 10.1007/s12602-012-9121-z.

- **Demande de brevet :**

Barthélémy C. Caradec T. Chevrot R. Didelot S. et Tambadou F. (27/01/2014). Synthétases de la colistine et cluster de gènes correspondants. Demande de **Brevet N° 1450641 CNRS/Université de la Rochelle** en cours.

- **Communications orales :**

F. Tambadou, T. Caradec, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry and R. Chevrot. Study of new NonRibosomal Peptide Synthetases (NRPSs) producing antibiotics of interest. (26 avril 2012). **6th European CF Young Investigator Meeting**, Institut Pasteur, Paris.

F. Tambadou, T. Caradec, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry et R. Chevrot. Développement de nouveaux antibiotiques destinés à lutter contre les infections pulmonaires. (février 2013). **14^{ème} colloque des jeunes chercheurs français en mucoviscidose**, Institut Pasteur, Paris.

F. Tambadou, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry et R. Chevrot. (mai 2013). Étude de nouveaux peptides antibiotiques. **Colloque des doctorants de 2^{ème} année**, La Rochelle.

- **Posters :**

Caradec T, Tambadou F, Sopéna V, Didelot S, Barthélémy C, Chevrot R. Etude des systèmes génétiques NRPS de production de nouveaux antibiotiques, anti *Pseudomonas aeruginosa* & *Staphylococcus aureus*. (2011). **12^{ème} colloque des jeunes chercheurs français en mucoviscidose**, Institut Pasteur, Paris.

F. Tambadou, T. Caradec, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry and R. Chevrot. Study of new NonRibosomal Peptide Synthetases (NRPSs) producing antibiotics of interest. (2012). **6th European CF Young Investigator Meeting**, Institut Pasteur, Paris.

F. Tambahou, T. Caradec, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry and R. Chevrot. Study of new NonRibosomal Peptide Synthetases (NRPSs) producing antibiotics of interest. (2012). **3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides**, Lille.

F. Tambahou, T. Caradec, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry et R. Chevrot. (2014) Découverte du mode de production de la Colistine. **15^{ème} colloque des jeunes chercheurs français en mucoviscidose**, Institut Pasteur, Paris.

F. Tambahou, T. Caradec, S. Didelot, C. Barthélémy, V. Thiéry and R. Chevrot. Study of new NonRibosomal Peptide Synthetases (NRPSs) producing antibiotics of interest. (2014). **4th International Symposium on Antimicrobial Peptides**, Lorient.

Tables des matières

Tables des matières.....	1
Tables des illustrations.....	7
Introduction Générale.....	15
Exposé Bibliographique	21
I <i>P. AERUGINOSA</i> DANS LA MUCOVISCIDOSE	23
.I.1 La mucoviscidose	23
.I.1.1 L'atteinte pulmonaire	24
.I.1.1.1 Les infections bactériennes.....	24
.I.2 Traitements des infections pulmonaires provoquées par <i>P. aeruginosa</i>	26
.I.2.1 Traitement de la primo-infection	27
.I.2.2 Traitement de l'infection chronique	27
.I.3 Utilisation de la colistine chez les malades atteints de mucoviscidose.....	28
II LES PEPTIDES NON-RIBOSOMIQUES.....	29
.II.1 Historique	29
.II.1.1 Diversité des monomères et des structures	29
.II.1.2 Activités biologiques	31
III LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE NON-RIBOSOMIQUE	34
.III.1 Mécanisme de synthèse	34
.III.2 Structure modulaire des NRPS.....	34
.III.3 Structure en domaines catalytiques	35
.III.3.1 Les domaines principaux	35
.III.3.1.1 Le domaine d'adénylation (A)	35
.III.3.1.2 Le domaine de thiolation (T).....	38
.III.3.1.3 Le domaine de condensation (C).....	39
.III.3.1.4 Le domaine thioestérase (Te)	41
.III.3.2 Les domaines secondaires.....	42
.III.3.2.1 Le domaine d'épimérisation (E).....	42

.III.3.2.2	Le domaine de cyclisation (Cy).....	43
.III.3.2.3	Les domaines d'oxydation (Ox) et de réduction (R)	44
.III.3.2.4	Le domaine de méthylation (Mt).....	45
.III.3.2.5	Le domaine de formylation (F)	45
.III.4	Modes de biosynthèses	47
IV	ANTIBIOTIQUES PRODUITS PAR LES <i>PAENIBACILLI</i>	50
.IV.1	Généralités.....	50
.IV.2	Les polymyxines	53
.IV.2.1	Bactéries productrices	53
.IV.2.2	Structure chimique	53
.IV.2.3	Spectre d'activité.....	54
.IV.2.4	Mécanisme d'action	54
.IV.2.5	Mécanisme de résistance.....	57
.IV.2.6	Utilisation clinique des polymyxines.....	60
.IV.2.7	Toxicité des polymyxines	62
.IV.2.7.1	Études initiales	62
.IV.2.7.2	Toxicité revisitée.....	62
.IV.2.7.3	Synthèse chimique	63
.IV.2.8	Production des polymyxines par l'industrie pharmaceutique	64
.IV.3	Les fusaricidines.....	64
V	CLUSTERS DE GÈNES DE PRODUCTION DES POLYMYXINES ET DES FUSARISCIDINES.....	66
.V.1	Cluster de biosynthèse des polymyxines (<i>pmx</i>)	66
.V.2	Cluster de biosynthèse des fusaricidines (<i>fus</i>).....	68
Matériel et Méthodes		69
I	TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES.....	71
.I.1	Matériel biologique	71
.I.1.1	Souches bactériennes et plasmides	71
.I.2	Milieus et conditions de culture.....	74

.I.2.1	Milieux de culture.....	74
.I.2.2	Milieux de productions d'antibiotiques	75
.I.2.3	Conditions de culture.....	76
.I.3	Conservation des souches.....	77
.I.4	Tests d'activités antimicrobiennes sur boîtes	77
.I.4.1	Préparation des surnageants.....	77
.I.4.2	Tests simple couche.....	77
.I.4.3	Tests en piqûre.....	78
II	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	79
.II.1	Extraction d'ADN	79
.II.1.1	Extraction d'ADN génomique.....	79
.II.1.2	Extraction d'ADN plasmidique (MiniPrep)	79
.II.1.3	Extraction d'ADN fosmidique (MaxiPrep)	80
.II.2	Dosage de l'ADN	80
.II.3	Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	80
.II.3.1	Mode opératoire.....	80
.II.3.2	Oligonucléotides	81
.II.4	Électrophorèse	82
.II.5	Purification des produits PCR.....	83
.II.6	Techniques de clonage	83
.II.6.1	Ligature dans le plasmide pGEM-T	83
.II.6.2	Préparation de bactéries compétentes JM109.....	84
.II.6.3	Transformation par choc thermique	85
.II.6.4	Analyse des clones recombinants	85
.II.6.5	Séquençage des plasmides.....	85
.II.7	Construction de banques d'ADN génomiques	86
.II.7.1	Principe de construction	86

.II.7.2	Extraction de l'ADN au phénol/chloroforme	87
.II.7.3	Fragmentation de l'ADN génomique	87
.II.7.4	Réparation de l'ADN	88
.II.7.5	Sélection des fragments de 35-45 Kb	88
.II.7.6	Préparation du vecteur pEpiFOS TM (banque B-LR)	89
.II.7.7	Ligation.....	90
.II.7.8	Encapsidation des produits de ligation	90
.II.7.9	Infection des bactéries	91
.II.7.9.1	Infection des cellules <i>E. coli</i> EPI100-T1R	91
.II.7.9.2	Infection des cellules <i>E. coli</i> Replicator FOS.....	91
.II.8	Criblage de la banque B-LR.....	92
.II.8.1	Utilisation d'amorces dégénérées	92
.II.8.2	PCR dégénérées sur colonies.....	92
.II.8.3	Digestion enzymatique des fosmides	93
.II.8.4	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	94
.II.8.5	Séquençage des clones.....	94
.II.8.6	Analyse <i>in silico</i>	94
.II.9	Mutagenèse insertionnelle.....	94
.II.9.1	Inactivation du gène <i>colE</i>	95
.II.9.1.1	Transformation du <i>Paenibacillus</i> B-LR.....	96
.II.9.2	Inactivation du gène <i>colA</i>	97
III	TECHNIQUES D'ANALYSE DES MOLÉCULES	97
.III.1	Préparation des échantillons.....	97
.III.2	Purification des molécules par Extraction Sur Phase solide (SPE).....	98
.III.2.1	Principe	98
.III.3	Étude des molécules par Chromatographie Liquide Ultra Performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/MS).....	99

.III.3.1	Principe	99
.III.3.2	Conditions d'analyse.....	100
.III.3.3	Spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS).....	101
Résultats et Discussion		103
A) Caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution des molécules antibiotiques produites par la souche B-LR.....		108
I	PRODUCTION ET EXTRACTION DES MOLÉCULES	108
II	SÉPARATION DES COMPOSÉS PAR UPLC-MS	109
III	ANALYSE DES STRUCTURES	112
.III.1	Composés possédant une partie cyclique à 5 acides aminés.....	113
.III.2	Composés possédant une partie cyclique à 6 acides aminés.....	115
.III.3	Composés possédant une partie cyclique à 7 acides aminés.....	117
B) Etude des systèmes NRPS des <i>Paenibacillus</i> B-LR et 32.....		123
IV	CONSTRUCTION DE BANQUES D'ADN GÉNOMIQUES	123
.IV.1	Clonage dans pSMART-FOS : banque de la souche 32	124
.IV.2	Clonage dans pEpiFOS TM : banque de la souche B-LR.....	125
V	CRIBLAGE DE LA BANQUE B-LR	126
.V.1	Mises au point des amorces.....	126
.V.2	Conclusion du criblage.....	133
.V.3	Sélection des clones à séquencer.....	135
VI	ANALYSE <i>IN SILICO</i> DES SÉQUENCES	136
.VI.1	Analyse du cluster NRPS de production de la colistine chez B-LR	137
.VI.2	Analyse des transporteurs colC et colD	144
.VI.3	Analyse des gènes en amont du cluster col	145
VII	ÉTUDE DU RÔLE DU CLUSTER COL DANS LA BIOSYNTHÈSE DES COLISTINES	146
.VII.1	Stratégie d'inactivation du gène <i>colA</i>	147
.VII.1.1	Phénotype des mutants.....	149
.VII.1.2	Difficultés méthodologiques liées à la souche B-LR.....	151

.VII.2 Croissance de la souche B-LR et des mutants en milieu supplémenté en acide diaminobutyrique	152
.VII.3 Analyse des surnageants par UPLC-MS	154
.VII.4 Bilan de la mutagénèse	154
C) Recherche de NRPS dans les microorganismes issus de la vasière intertidale.....	155
Article 1.....
Conclusion et Perspectives.....	157
Références Bibliographiques	163
Annexes.....	189
Article 2.....

Tables des illustrations

Liste des Figures :

Figure 1 : Le gène et la protéine CFTR d'après Gibson et collaborateurs (Gibson <i>et al.</i> , 2003).	23
Figure 2 : Bactéries cliniquement importantes dans le cadre de la mucoviscidose en France. D'après le Registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2012.	25
Figure 3 : Exemples de peptides non-ribosomiques illustrant la diversité et les caractéristiques structurales de ces peptides (Sieber & Marahiel, 2005).	31
Figure 4 : Répartition des 6 classes d'activités biologiques de 1272 peptides non-ribosomiques recensés dans la base de données Norine.	32
Figure 5 : Structure modulaire des NRPS avec les domaines de base pour l'initiation, l'élongation et la terminaison (adapté de Strieker <i>et al.</i> , 2010).	35
Figure 6 : Réaction d'activation de deux monomères sélectionnés par les domaines A en aminoacyl-O-AMP (Bachmann & Ravel, 2009).	36
Figure 7 : Représentation des 10 acides aminés impliqués dans le site de fixation du substrat au sein d'un domaine d'adénylation (adapté de Stachelhaus <i>et al.</i> , 1999).	37
Figure 8 : Formation de deux aminoacyl-thioesters fixés aux domaines T (Bachmann & Ravel, 2009).	39
Figure 9 : Formation de la liaison peptidique entre deux substrats aminoacyl-thioester par le domaine C (Bachmann & Ravel, 2009).	40
Figure 10 : Réaction d'hydrolyse et de cyclisation de la chaîne peptidique catalysée par le domaine thioestérase lors de l'assemblage de la surfactine (Sieber & Marahiel, 2003).	41
Figure 11 : Position des domaines secondaires dans un module d'élongation (adapté de Lautru & Chalis, 2004 ; Fischbach & Walch, 2005).	42
Figure 12 : Réaction d'épimérisation de l'acide aminé fixé sur le domaine T catalysée par le domaine E (Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	43
Figure 13 : Réaction de cyclisation catalysée par le domaine Cy entre deux acides aminés fixés sur deux domaines T de modules adjacents (T1 et T2) (Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	44
Figure 14 : Réaction d'oxydation de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	44
Figure 15 : Réaction de réduction de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	45
Figure 16 : Réaction de méthylation de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	45
Figure 17 : Réaction de formylation de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	46
Figure 18 : Biosynthèse linéaire (type A) de l'ACV (Mootz <i>et al.</i> , 2002).	47
Figure 19 : Biosynthèse itérative (type B) de l'entérobactine (Mootz <i>et al.</i> , 2002).	48

Figure 20 : Biosynthèse non linéaire (type C) de la vibriobactine (Mootz <i>et al.</i> , 2002).	48
Figure 21 : Structure chimique des différents groupes de polymyxines.	52
Figure 22 : Modèles moléculaires illustrant les interactions entre la polymyxine B ₁ et la structure du lipide A de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Velkov <i>et al.</i> , 2013).	56
Figure 23 : Activité antimicrobienne de la polymyxine B sur la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Velkov <i>et al.</i> , 2010).	57
Figure 24 : Systèmes de régulation à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (adapté de Kato <i>et al.</i> , 2003 ; Falagas <i>et al.</i> , 2010).	58
Figure 25 : Mécanismes de résistance aux polymyxines développés par les bactéries à Gram négatif (adapté de Velkov <i>et al.</i> , 2013).	60
Figure 26 : Structures de la polymyxine B et des dérivés NAB739, NAB741 et NAB7061 synthétisés (Mingeot-Leclercq <i>et al.</i> , 2012).	63
Figure 27 : Structure chimique des fusaricidines A, B, C et D produites par <i>P. polymyxa</i> .	65
Figure 28 : Clusters NRPS de production de la polymyxine A (<i>pmx</i>) et des fusaricidines (<i>fus</i>) chez <i>P. polymyxa</i> d'après (Li <i>et al.</i> , 2007 ; Choi <i>et al.</i> , 2009 ; Shaheen <i>et al.</i> , 2011).	66
Figure 29 : Schéma général des tests d'activités en boîte simple couche.	78
Figure 30 : Carte du plasmide pGEM [®] -T.	84
Figure 31 : Étapes de construction d'une banque fosmidique.	86
Figure 32 : Carte du fosmide pEpiFOS [™] -5.	89
Figure 33 : Carte du fosmide pSMART-FOS.	90
Figure 34 : Schéma général du criblage de la banque B-LR.	93
Figure 35 : Carte du plasmide pGEM-7Zf(+).	95
Figure 36 : Carte du plasmide pOJ260 (d'après Bierman <i>et al.</i> , 1992).	97
Figure 37 : Structure du depsipeptide L produit par la souche 32 (m/z 786.6).	105
Figure 38 : Protocole de production et d'extraction des molécules du surnageant de culture de la souche B-LR avant analyse en UPLC.	109
Figure 39 : Structures chimiques et masses des lipopeptides produits par B-LR possédant une partie cyclique à 5 acides aminés déterminées par MS/MS.	113
Figure 40 : Structures des composés antibiotiques produits par B-LR identifiés par spectrométrie de masse basse résolution.	114
Figure 41 : Structures chimiques et masses des lipopeptides produits par B-LR possédant une partie cyclique à 6 acides aminés déterminées par MS/MS.	115
Figure 42 : Comparaison des structures possédant un cycle à cinq acides aminés (A.) et un cycle à six acides aminés (B.)	116
Figure 43 : Structures chimiques et masses des lipopeptides produits par B-LR possédant une partie cyclique à 7 acides aminés déterminées par MS/MS.	117

Figure 44 : (A) Spectre MS/MS correspondant à la fragmentation de l'ion précurseur dichargé (m/z 585,39). (B) Structure proposée pour le peptide correspondant colistine E ₁ .	119
Figure 45 : (A) Spectre MS/MS correspondant à la fragmentation de l'ion précurseur dichargé (m/z 578,38). (B) Structure proposée pour le peptide correspondant colistine E ₂ .	120
Figure 46 : (A) Spectre MS/MS correspondant à la fragmentation de l'ion précurseur dichargé (m/z 571,38). (B) Structure proposée pour le peptide correspondant Val-E ₂ .	121
Figure 47 : Structures des peptides antibiotiques d'intérêts majoritairement produits par le <i>Paenibacillus</i> B-LR identifiées par spectrométrie de masse.	126
Figure 48 : Alignement des domaines d'adénylation conservés impliqués dans l'incorporation de l'acide diaminobutyrique (L-Dab) à partir des séquences NRPS du cluster de production de la polymyxine A (<i>pmx</i>) chez <i>P. polymyxa</i> E681 (Choi <i>et al.</i> , 2009).	127
Figure 49 : Gel d'agarose des témoins positifs et négatifs permettant de valider les amorces LDAB (395 pb).	128
Figure 50 : Détection sur gel d'agarose des fragments amplifiés par PCR sur colonies des clones de la banque B-LR avec les amorces LDAB-F et LDAB-R (395 pb).	129
Figure 51 : Alignement de séquences nucléiques des domaines d'adénylation impliqués dans l'incorporation de la leucine dans les synthétases PmxA des polymyxines A et B.	130
Figure 52 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR sur colonies avec les amorces Leu1Pa-F et Leu1Pa-R (350 pb).	130
Figure 53 : Alignement de séquences nucléiques des domaines d'adénylation impliqués dans l'incorporation de l'isoleucine dans les synthétases de la bacitracine, de la fengycine et de la lichenysine pour définir les amorces dégénérées IsoL.	131
Figure 54 : Gel d'électrophorèse du criblage par PCR sur colonies avec les amorces Isol-F et IsoL-R (250 pb).	131
Figure 55 : Représentation schématique des alignements de séquences nucléiques des domaines d'adénylation impliqués dans l'incorporation de la proline dans les synthétases de la tyrocidine et de la gramicidine pour définir les amorces dégénérées Pro3.	132
Figure 56 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR sur colonies avec les amorces pmxC-F et pmxC-R (1800 pb).	132
Figure 57 : Vérification par électrophorèse PFGE de la taille des inserts des clones positifs 35, 73, 42 et 80 après digestions enzymatiques.	135
Figure 58 : Organisation et annotation des ORFs retrouvés sur 50,4 kb avec le cluster <i>col</i> de production putatif de la colistine chez le <i>Paenibacillus</i> B-LR.	137
Figure 59 : Cluster de gènes putatif de biosynthèse de la colistine (<i>col</i>) chez le <i>Paenibacillus</i> B-LR et déduction de la structure primaire de la colistine synthétisée.	139

Figure 60 : Alignement des séquences d'acides aminés des dix domaines de thiolation du cluster <i>col</i> chez B-LR	143
Figure 61 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour inactiver le gène <i>colA</i> par simple recombinaison homologue chez le <i>Paenibacillus</i> B-LR.	148
Figure 62 : Effet antimicrobien de 10 µL du surnageant de culture de la bactérie B-LR et des mutants m5, m8 et m12 sur un tapis bactérien de <i>P. aeruginosa</i> BM0207.	150
Figure 63 : Structure de l'acide diaminobutyrique (Dab) retrouvé dans les polymyxines.	152
Figure 64 : Effet antimicrobien de 10 µL du surnageant de culture M63T et M63T supplémenté en Dab de la bactérie B-LR et du mutant m5 sur un tapis bactérien de <i>P. aeruginosa</i> BM0207.	153

Liste des Tableaux :

Tableau 1 : Liste des motifs conservés caractéristiques des domaines impliqués dans la synthèse non-ribosomique (Marahiel <i>et al.</i> , 1997 ; Schwarzer <i>et al.</i> , 2003).	37
Tableau 2 : Caractéristiques des peptides antimicrobiens du premier groupe.	50
Tableau 3 : Caractéristiques des peptides antimicrobiens du second groupe.	51
Tableau 4 : Souches microbiennes et conditions de cultures utilisées dans ce travail.	71
Tableau 5 : Liste des plasmides utilisés.	73
Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés lors de cette étude pour les réactions de PCR.	82
Tableau 7 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des composés des surnageants purifiés par SPE sur le système UPLC/MS.	101
Tableau 8 : Paramètres d'ionisation et de détection utilisés en MS.	101
Tableau 9 : Paramètres d'ionisation et de détection utilisés en MS/MS.	102
Tableau 10 : Spectres d'activités antimicrobiennes des surnageants de culture des souches « 32 », « B-LR » et de la colistine (5 µg).	106
Tableau 11 : Ions parents obtenus après analyse en UPLC-MS du surnageant de culture de la souche B-LR.	111
Tableau 12 : Tableau du criblage par PCR sur colonies des 28 clones de la banque B-LR.	134
Tableau 13 : Fonctions déduites, tailles et pourcentage d'identités des ORFs retrouvés après séquençage, avec des protéines homologues retrouvés chez les <i>Paenibacillus</i> .	136
Tableau 14 : Comparaison des séquences protéiques du cluster <i>col</i> avec les clusters <i>pmx</i> des souches de <i>P. polymyxa</i> PKB1, E681 et ATCC21830 productrices de polymyxines B, A et E respectivement.	138
Tableau 15 : Prédictions des acides aminés incorporés par les domaines d'adénylation de la colistine synthétase à partir des signatures de reconnaissance du substrat.	141
Tableau 16 : Comparaison des acides aminés conférant la spécificité des domaines d'adénylation des polymyxines synthétases des souches E681, PKB1, ATCC21830, M-1 et B-LR.	142
Tableau 17 : Comparaison de la séquence protéique de l'ORF7 de B-LR avec des gènes homologues à EctB chez les <i>Paenibacillus</i> et chez <i>Halobacillus halophilus</i> .	146

Introduction Générale

La découverte accidentelle de la pénicilline en 1928, et sa production industrielle 15 ans plus tard, ont bouleversé le traitement des infections microbiennes. Durant les années 1940 à 1970, la recherche sur les antibiotiques prend son essor avec la découverte de nombreux composés.

Leur utilisation a représenté une avancée majeure pour la médecine moderne, récompensée par le Prix Nobel de Médecine de Sir Alexander Fleming, Ernest B. Chain, et Sir Howard Florey en 1945. Mais depuis cette époque pionnière, l'usage généralisé de ces molécules et la pression de sélection exercée par les traitements antibiotiques ont provoqué l'apparition de résistances (Aleksun & Levy, 2007 ; Giske *et al.*, 2008 ; Livermore, 2007 ; Perez *et al.*, 2007). Ainsi, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante des résistances aux antibiotiques avec une évolution vers la multi-résistance de bactéries pathogènes responsables d'infections.

Cette situation est particulièrement inquiétante avec les bactéries à Gram négatif comme certains *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae* devenues résistantes à la quasi-totalité des antibiotiques actuellement disponibles (Payne *et al.*, 2007). En parallèle, depuis les années 90 il n'y a pas eu de développement de nouveaux antibiotiques hormis la daptomycine.

Face aux options thérapeutiques limitées, des molécules anciennes comme les polymyxines constituent parfois la seule alternative et reviennent en première ligne pour le traitement des infections dues aux bactéries Gram-négatif multirésistantes (Li *et al.*, 2006 ; Antoniadou *et al.*, 2007 ; Boucher *et al.*, 2009 ; Michalopoulos & Karatza, 2010). C'est ainsi que dans le cas de la Mucoviscidose, la polymyxine E, aussi appelée colistine est utilisée comme ultime recours pour lutter contre *Pa*.

La colistine est un lipopeptide antibiotique découvert en 1949 pour le traitement des infections dues aux bactéries Gram-négatif. Après plusieurs années d'utilisation clinique, elle a été associée à une néphrotoxicité et une neurotoxicité. Ainsi, elle a été peu à peu remplacée par d'autres antibiotiques considérés moins toxiques. Récemment, son utilisation a connu un regain d'intérêt avec l'apparition de bactérie Gram-négatif résistantes à la plupart des antibiotiques disponibles sur le marché excepté la colistine (Biswas *et al.*, 2012 ; Martis *et al.*, 2014).

Chez les malades atteints de Mucoviscidose, *Pa* est responsable d'infections pulmonaires graves qui sont la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients (Ramsey *et al.*, 1996). Chez ces malades, l'épithélium pulmonaire est anormal, permettant une colonisation par

plusieurs pathogènes opportunistes dont le plus significatif est *Pa* (Ramsey *et al.*, 1996 ; Becq *et al.*, 2003). Deux types d'infections sont générés par cette bactérie : une primo-infection caractérisée par la sécrétion de nombreuses toxines et une infection chronique caractérisée par la formation d'une communauté bactérienne persistante organisée en biofilm résistant aux antibiotiques. Ces infections sont impossibles à éradiquer et conduisent à une défaillance pulmonaire qui entraîne la mort. L'utilisation de l'antibiothérapie est une mesure temporairement efficace pour lutter contre ces infections (Hoiby, 2002). La répétition des traitements antibiotiques entraîne, chez ces patients, l'émergence de souche de *Pa* résistantes à de multiples antibiotiques.

La découverte de stratégies originales ainsi que de nouvelles molécules permettant de lutter contre les infections provoquées par *Pa* apparaît indispensable.

Des travaux antérieurs effectués par notre équipe ont permis d'isoler deux souches de *Paenibacillus* (codées B-LR & 32) inhibant la croissance de pathogènes impliqués dans la Mucoviscidose :

- La souche B-LR a été isolée de l'environnement. Elle présente une forte activité antimicrobienne orientée contre des bactéries Gram-négatives dont de nombreux *Pa*. Elle produit des composés antibiotiques partageant des similarités avec les polymyxines déjà commercialisées.
- La souche 32 a été isolée à partir d'une expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose. Son surnageant de culture affecte principalement des bactéries Gram-positives, des levures, mais aussi des moisissures. Elle produit au moins une nouvelle molécule antibiotique proche des fusaricidines. La découverte de cette bactérie a déjà fait l'objet d'une publication (Chevrot *et al.*, 2013, voir Annexe 1).

Les polymyxines et les fusaricidines sont des polypeptides cycliques produits par les *Paenibacillus* par voie non-ribosomique, via des NonRibosomal Peptides Synthétases (NRPS). Les NRPS sont des complexes multienzymatiques qui permettent une synthèse de peptides indépendamment des ribosomes. De tels complexes ont été décrits chez de nombreux micro-organismes (*Bacillus*, *Streptomyces*) et sont impliqués dans la production de molécules, dont des médicaments importants comme la cyclosporine, la gramicidine, la vancomycine et la pénicilline (Donadio *et al.*, 2007 ; Felnagle *et al.*, 2007). Les molécules produites par les NRPS sont obtenues après assemblage d'acides aminés protéogéniques mais aussi d'environ 500 monomères inusuels (ex : acide diaminobutyrique ou Dab dans les polymyxines).

L'enchaînement de ces monomères n'est pas totalement spécifique, ainsi, certains monomères peuvent se substituer à d'autres de façon aléatoire lors de la synthèse, augmentant ainsi la variabilité des structures (Strieker *et al.*, 2010). L'effet antibiotique des peptides non-ribosomiques reposerait donc sur l'action conjointe de plusieurs molécules aux structures proches. La production de tels mélanges pourrait présenter un caractère avantageux d'un point de vue évolutif en limitant l'apparition de résistances.

Jusqu'ici la biosynthèse des polymyxines dont la colistine, et les systèmes génétiques à l'origine de leur production étaient peu connus. Ce manque de connaissance a limité leur développement et leur amélioration.

L'objectif principal de ce travail est l'étude des clusters de gènes NRPS impliqués dans la production des nouveaux antibiotiques partageants des homologies de structure avec les polymyxines et les fusaricidines chez les *Paenibacillus* B-LR et 32.

Parallèlement, dans le cadre d'une collaboration interne avec l'équipe DYFEA (DYnamique Fonctionnelle des Ecosystèmes côtiers Anthropisés), nous avons mis au point un criblage par PCR dégénérées pour rechercher des nouvelles NRPS chez des micro-organismes issus de la vasière.

Dans l'exposé bibliographique qui va suivre, la première partie traitera de la pathogénicité de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose. Cela nous permettra de comprendre les atteintes pulmonaires de la maladie ainsi que les traitements utilisés en cas d'infection à *P. aeruginosa*.

Les deuxième et troisième parties présenteront le fonctionnement des Non-Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS) pour mieux comprendre et mettre en évidence la spécificité de cette voie de synthèse.

La quatrième partie fera le lien entre les parties précédentes en décrivant les composés antibiotiques produits par les souches de *Paenibacillus* dont les polymyxines, qui sont des peptides non-ribosomiques utilisés pour traiter les malades mucoviscidosiques.

La cinquième et dernière partie sera dédiée à la description des clusters NRPS de production des polymyxines et des fusaricidines.

Exposé Bibliographique

I *P. AERUGINOSA* DANS LA MUCOVISCIDOSE

.I.1 La mucoviscidose

Avec une incidence estimée en France à une naissance sur 4600, la mucoviscidose (ou fibrose kystique du pancréas) est la maladie génétique la plus fréquente dans les populations caucasiennes (Munck *et al.*, 2005). C'est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive qui touche environ 70000 personnes dans le monde (Gibson *et al.*, 2003 ; Farrell, 2008). Elle a pour origine une ou plusieurs mutations d'un gène du bras long du chromosome 7 codant pour la protéine CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (Figure 1). Plus de 1900 mutations ont été identifiées à ce jour, la plus fréquente (80 % des malades en France) est la délétion de la Phénylalanine en position 508, autrement nommée « F508del » (Registre Français de la Mucoviscidose).

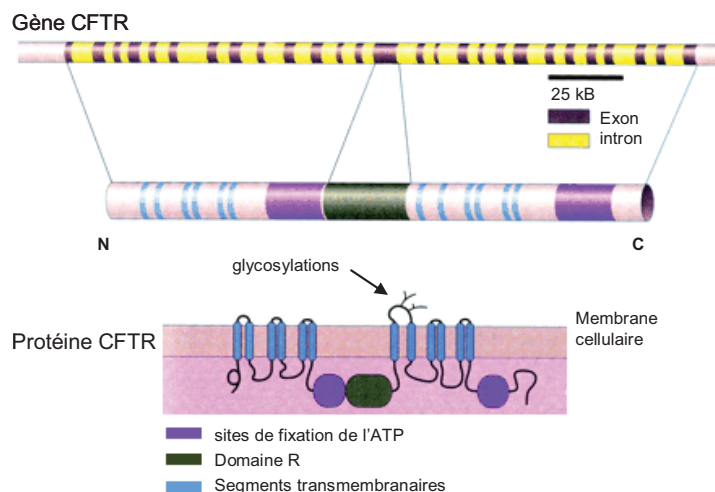


Figure 1 : Le gène et la protéine CFTR d'après Gibson et collaborateurs (Gibson *et al.*, 2003).

La protéine CFTR est localisée sur la membrane des cellules épithéliales des intestins, des voies aériennes et reproductrices. Elle est également présente dans les cellules des glandes salivaires, sudoripares et pancréatiques. C'est un canal échangeur de chlore impliqué dans la régulation des échanges ioniques épithéliaux de chlore, de sodium et d'eau (Rowe *et al.*, 2005). Dans l'épithélium respiratoire, les mutations de la protéine CFTR sont responsables de perturbations des échanges ioniques entraînant une déshydratation du film séro-muqueux. Ainsi, la modification des propriétés rhéologiques du mucus, et notamment l'augmentation de sa viscosité, favorise l'accumulation et la fixation des bactéries dans les poumons.

Le mucus est normalement constitué de deux phases. La plus externe, visqueuse, sert à piéger les particules et les microorganismes. À la surface apicale de l'épithélium pulmonaire existe également une deuxième couche plus fluide dans laquelle battent les cils des cellules ciliées. Leurs battements font normalement remonter le mucus pour qu'il soit dégluti. Chez les malades atteints de mucoviscidose, ce mécanisme de nettoyage est pris en défaut, les mouvements des cils étant entravés par la viscosité du mucus.

En outre, il semble que le mauvais fonctionnement du canal chlore n'affecte pas uniquement la viscosité du mucus bronchique mais aussi sa concentration en sel. En plus d'être épaissi, le mucus pourrait être également très salé ce qui nuirait au bon fonctionnement des défensines, molécules antibactériennes naturellement synthétisées par le poumon (Bals *et al.*, 1998). Ces différentes déficiences font du poumon malade une entité non stérile par comparaison au poumon sain (Bergogne-Bérézin, 2002).

.I.1.1 L'atteinte pulmonaire

La mucoviscidose est une pathologie multiviscérale qui affecte principalement les voies aériennes pulmonaires, l'intestin, le pancréas, le foie, les tubes séminifères et les glandes sudoripares (Rowe *et al.*, 2005). Les atteintes pulmonaires restent prédominantes dans le tableau clinique de la mucoviscidose et conditionnent le pronostic vital. Elles sont responsables de plus de 90 % des décès (Ramsey, 1996). La viscosité du mucus conduit à une obstruction chronique des bronches qui favorise la colonisation par plusieurs pathogènes opportunistes dont le plus significatif est *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) (Ramsey, 1996 ; Becq, 2003). Cette infection bactérienne évolue rapidement vers une inflammation chronique qui contribue à la destruction des parois bronchiques, conduisant ainsi à une insuffisance respiratoire majeure.

.I.1.1.1 Les infections bactériennes

Le système broncho-pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose est très sensible aux infections bactériennes causées par différentes souches pathogènes (Figure 2).

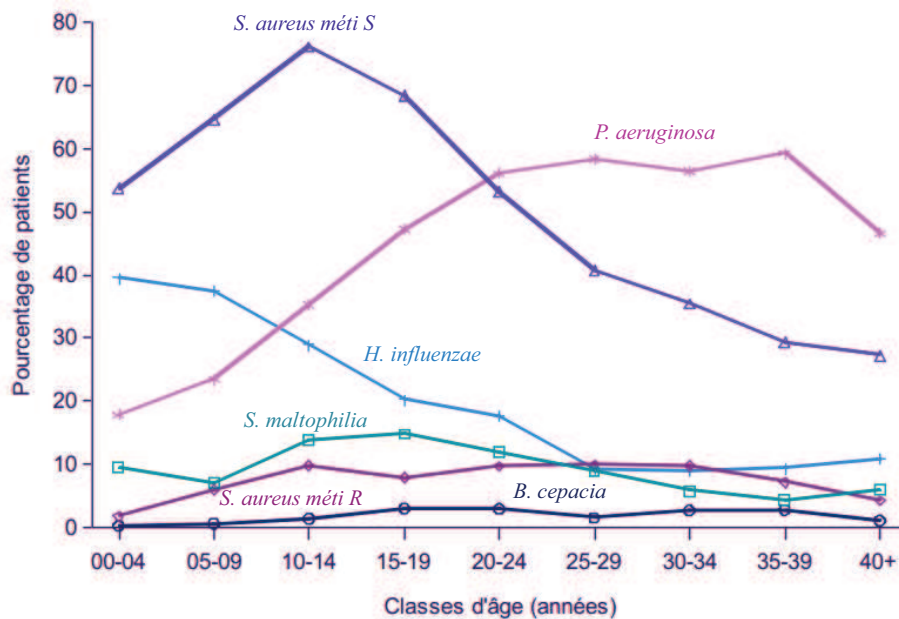


Figure 2 : Bactéries cliniquement importantes dans le cadre de la mucoviscidose en France. D'après le Registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2012.

S. aureus méti S = *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline. *S. aureus méti R* = *S. aureus* résistant à la méticilline. *H. influenzae* = *Haemophilus influenzae*. *S. maltophilia* = *Stenotrophomonas maltophilia*. *B. cepacia* = *Burkholderia cepacia*.

Chez les enfants malades on isole dans un premier temps, principalement *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* dans les sécrétions respiratoires (Figure 2). Peu à peu, leur prévalence a tendance à décroître au profit des infections causées par *Pa. Stenotrophomonas maltophilia* et *Alcaligenes xylosoxidans* sont retrouvés tout au long de la vie des patients mais leur rôle dans l'évolution de la maladie n'est pas toujours clairement établi. *Burkholderia cepacia*, est particulièrement redouté pour sa multirésistance aux antibiotiques (Malott *et al.*, 2014). D'autres agents bactériens, viraux ou fongiques peuvent également s'associer à cette colonisation bactérienne des poumons.

Toutefois l'infection chronique à *Pa* constitue le problème infectieux principal et marque le plus souvent un tournant évolutif délétère dans la maladie (Taylor *et al.*, 1990 ; Mariani & Bingen, 2003 ; Muhlebach *et al.*, 2006). C'est la bactérie la plus répandue chez les patients de plus de 10 ans, et son éradication reste difficile malgré une prise en charge précoce de l'infection par une antibiothérapie adaptée. En effet, *Pa* possède de nombreux facteurs de virulence qui lui permettent de coloniser les poumons des malades et de se développer dans

cette environnement. En plus de ces facteurs de virulence, *Pa* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques, et du fait de formidables facultés d'adaptation, elle est capable de développer rapidement des résistances à de nouveaux antibiotiques. Cette résistance peut être également due à l'utilisation de transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Par exemple la pompe MexAB-OprM permet l'efflux de certaines β -lactamines et la pompe MexXY-OprM l'efflux des aminosides (Masuda *et al.*, 2000).

Des modifications des souches de *Pa* issues des poumons des malades atteints de mucoviscidose ont été observées. L'adaptation la plus notable de cette bactérie est son développement dans le poumon malade sous la forme de biofilms structurés (Drenkard & Ausubel, 2002). Ce mode de vie permet à *Pa* de résister aux traitements antibiotiques les plus drastiques mais aussi d'échapper à la phagocytose (Hoiby, 2002). Ces souches sont souvent dépourvues de flagelle et fréquemment mucoïdes (surproduction d'alginate). Cette production d'alginate joue un rôle essentiel dans le passage à la chronicité de l'infection pulmonaire. En outre, certaines souches de *Pa* présentent un lipopolysaccharide (LPS) modifié permettant une résistance accrue aux peptides antimicrobiens cationiques et sont souvent dépourvues d'antigène O rendant les bactéries « invisibles » pour le système immunitaire (Ernst *et al.*, 1999 ; Ernst *et al.*, 2006). Les souches de *Pa* responsables d'infections pulmonaires peuvent surproduire la pyocyanine et présentent par ailleurs de nombreuses auxotrophies (Thomas *et al.*, 2000 ; Fothergill *et al.*, 2007). La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie et impliqué dans sa virulence (Lau *et al.*, 2004).

.I.2 Traitements des infections pulmonaires provoquées par *P. aeruginosa*

Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement curatif de la mucoviscidose. Cependant, de grands progrès ont été faits dans la prise en charge, avec notamment la mise en place des Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) et l'amélioration des thérapeutiques permettant ainsi d'augmenter l'espérance de vie des malades. Un malade pris en charge dans un pays développé a plus de 50 % de chances de vivre jusqu'à 40 ans alors qu'il y a 50 ans, 90% des enfants mourraient avant l'âge de 2 ans en raison d'une insuffisance pancréatique (Wolfenden & Schechter, 2009 ; Mehta *et al.*, 2010). En France, depuis 2001, les malades sont pris en charge par des CRCM constitués d'une équipe pluridisciplinaire de

médecins, infirmières, kinésithérapeutes, diététiciens, psychologues, assistantes sociales et généticiens. C'est le lieu où les choix thérapeutiques sont pris, expliqués, et où les différents intervenants coordonnent les soins à réaliser (Bellon, 2005).

L'amélioration de la fonction respiratoire repose essentiellement sur l'association d'une kinésithérapie respiratoire pour éviter l'accumulation du mucus dans les bronches, avec une antibiothérapie pour lutter contre les infections. Le choix des antibiotiques et la durée du traitement sont guidés par les résultats de l'examen cytbactériologique des crachats (ECBC) et varie en fonction d'une primo-infection ou d'une infection chronique.

Outre les traitements antibiotiques, les malades atteints de mucoviscidose ont également recours à des thérapies visant à fluidifier et à expectorer le mucus accumulé dans les poumons (Foucaud *et al.*, 2006).

.I.2.1 Traitement de la primo-infection

La prise en charge des primo-colonisations par une antibiothérapie précoce améliore très significativement l'état de santé du malade. Ces soins sont facilités par le fait que les souches de *Pa* responsables de ces infections sont issues de l'environnement et généralement sensibles à l'antibiothérapie. La plupart des équipes françaises utilisent en association 2 antibiotiques bactéricides (β -lactamine et aminoside) par voie intraveineuse pendant 14 à 21 jours, suivis ou non d'aérosols de colistine (Colimycine[®]) pendant 3 à 6 mois dans le but d'éradiquer la bactérie et de retarder le passage à l'infection chronique (Conférence de consensus 2002). Une autre alternative consiste à utiliser une association de Ciprofloxacine (Ciflox[®]) par voie orale avec des aérosols de colistine pendant 3 à 6 mois (protocole Danois).

.I.2.2 Traitement de l'infection chronique

Le passage à la chronicité se traduit par des modifications des souches de *Pa* qui sécrètent des quantités importantes d'alginate. Le passage à un mode de vie en biofilm épais, adhérent, diminue notablement l'efficacité bactéricide des antibiotiques, en particulier celle des aminosides (Mariani & Bingen, 2003). À ce stade, il est impossible d'éradiquer la bactérie. Le traitement a donc pour but de diminuer l'inoculum bactérien, d'espacer les exacerbations et de ralentir la dégradation fonctionnelle respiratoire. Les antibiotiques sont choisis en fonction du dernier antibiogramme et sont utilisés seuls ou en association par voie orale, intraveineuse ou inhalée. En présence de souches multirésistantes de *Pa*, une trithérapie est recommandée

(β -lactamine + tobramycine + ciprofloxacine par voie orale). La colistine par voie intraveineuse reste un choix possible. En traitement d'entretien de l'infection chronique à *Pa*, les antibiotiques inhalés (colistine et tobramycine) sont recommandés (Conférence de consensus 2002).

.I.3 Utilisation de la colistine chez les malades atteints de mucoviscidose

La colistine est un antibiotique appartenant à la famille des polymyxines. C'est un polypeptide cyclique, cationique qui cible les membranes bactériennes. En France la colistine est commercialisée par SANOFI-AVENTIS sous le nom de Colimycine® (Haute Autorité de Santé ou HAS). Par voie inhalée, elle est disponible sous forme de colistiméthate sodique en poudre et solvant pour nébulisation. La solution pour inhalation est préparée extemporanément. Elle est indiquée chez les malades atteints de mucoviscidose pour le « traitement précoce de la primo-colonisation à *P. aeruginosa* en relais d'une cure d'antibiotiques administrés par voie intraveineuse » et le « traitement des infections pulmonaires chroniques dues à *Pa* » (HAS).

Chez ces malades, la colistine sous forme d'aérosol est utilisée depuis ces 30 dernières années pour traiter la colonisation des voies respiratoires par *Pa* (Littlewood *et al.*, 1985 & 2000 ; Jensen *et al.*, 1987 ; Frederiksen *et al.*, 1997 ; Bauldoff *et al.*, 1997 ; Conway *et al.*, 2003 ; Hoiby *et al.*, 2005).

II LES PEPTIDES NON-RIBOSOMIQUES

.II.1 Historique

La pénicilline, le plus célèbre des antibiotiques ; la cyclosporine, utilisée comme immunosuppresseur ; la daptomycine (Cubicin[®]) utilisée dans le traitement des infections par des bactéries à Gram-positif ; la bléomycine (Blenoxane[®]) utilisée comme médicament en chimiothérapie anticancéreuse ou encore la colistine (Colimycine[®]) utilisée pour le traitement des infections pulmonaires ont tous un point commun : leur voie de biosynthèse. Ces molécules appartiennent à la famille des peptides synthétisés par la voie non-ribosomique qui fut décrite pour la première fois en 1971 (Lipmann *et al.*, 1971).

Dans les années soixante, des chercheurs Norvégiens et Japonais qui travaillaient sur la biosynthèse de la gramicidine S par *Bacillus brevis* découvrent qu'en présence de RNAses ou d'inhibiteurs de la synthèse ribosomique, les extraits cellulaires de la bactérie étaient toujours capables de synthétiser cet antibiotique (Tomino *et al.*, 1967). Ils en ont déduit qu'il existait un mécanisme de synthèse peptidique indépendant de l'ARN et ont découvert ensuite chez cette bactérie de grandes enzymes dont la fonction était inconnue (Marahiel *et al.*, 2003). En 1971 Fritz Lipmann et ses collègues les isolèrent et montrèrent qu'elles étaient bien impliquées dans la fabrication de la gramicidine S. Ces enzymes sont aujourd'hui appelées synthétases de peptides non-ribosomiques, synthétases, ou Non-Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS). Les NRPS sont donc les enzymes responsables de la synthèse peptidique non-ribosomique et produisent une grande variété de peptides non-ribosomiques chez les bactéries et les champignons. Ces peptides présentent des particularités au niveau de leur composition chimique, de leur structure et de leur spectre d'activités biologiques. Pour les micro-organismes producteurs, ces peptides jouent un rôle important dans la défense contre des espèces concurrentes lorsque les ressources nutritives sont limitées.

.II.1.1 Diversité des monomères et des structures

Contrairement à la synthèse peptidique classique qui utilise les 20 acides aminés protéogéniques, la biosynthèse non-ribosomique utilise en plus de ces 20 acides aminés d'autres molécules non protéogéniques. C'est pour cette raison que nous utiliserons le terme de monomères pour désigner les molécules précurseurs incorporées dans les peptides non-ribosomiques. Actuellement le nombre de monomères identifiés par la base de données

Norine sur l'ensemble des peptides non-ribosomiques est supérieur à 500 (Caboche *et al.*, 2008 & 2010). Ces monomères incluent des acides aminés non protéogéniques (formes D, hydroxylés, méthylés), des acides gras ou encore des sucres.

Les synthétases peuvent aussi contenir des domaines facultatifs qui sont capables de modifier la structure des monomères incorporés, ce qui augmente encore la diversité de ces peptides. Dans la base de données Norine, les plus petits peptides non-ribosomiques référencés sont composés de 2 monomères comme la brévianamide F (Maiya *et al.*, 2006), et les plus grands contiennent 48 monomères comme les polythéonamides isolés d'éponge marine (Hamada *et al.*, 2005). Des produits tels que des lipides ou des hydrates de carbone issus d'autres voies de biosynthèse peuvent également être incorporés.

En plus de la diversité de leur composition, les peptides non-ribosomiques présentent des structures particulières qui sont souvent complexes. On retrouve des structures linéaires (comme le tripeptide ACV, précurseur de la pénicilline), branchées (la vibriobactine), partiellement cycliques (les polymyxines), totalement cycliques (la cyclosporine A), voire complexes (la vancomycine) (Caboche *et al.*, 2010). Ces structures peuvent contenir des N-méthylations, des N-formylations, des glycosylations, des insertions d'acétate ou de propionate ainsi que des acides gras (Schwarzer *et al.*, 2003) (Figure 3). Ainsi la diversité des monomères et des structures permet d'obtenir des molécules complexes ayant des propriétés pharmacologiques intéressantes.

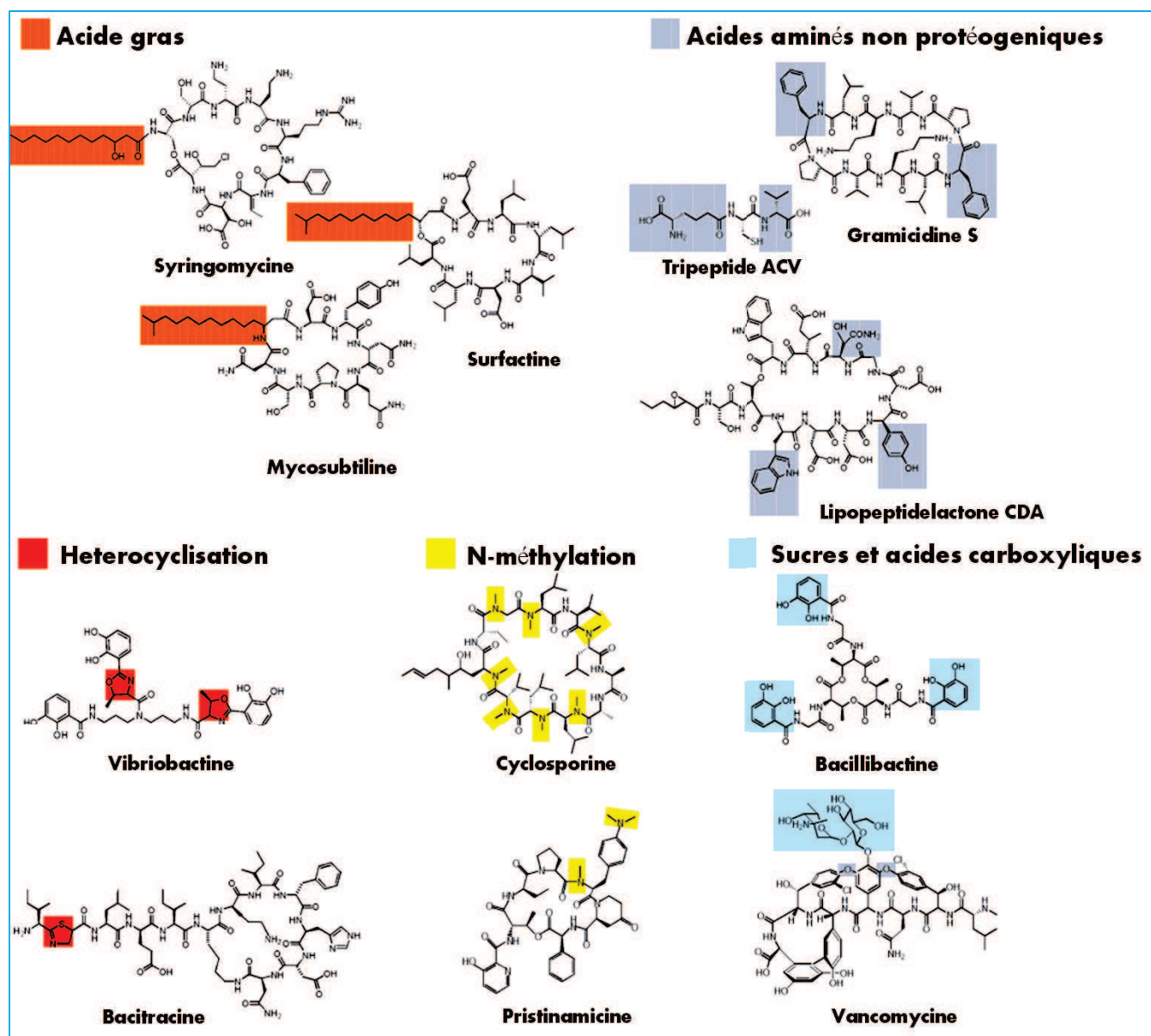


Figure 3 : Exemples de peptides non-ribosomiques illustrant la diversité et les caractéristiques structurales de ces peptides (Sieber & Marahiel, 2005).

.II.1.2 Activités biologiques

Les peptides non-ribosomiques sont des produits naturels qui présentent un large éventail d'activités biologiques et de propriétés pharmacologiques (Schwarzer *et al.*, 2003 ; Felnagle *et al.*, 2007). Ces activités sont fortement liées à leur structure (Peypoux *et al.*, 1999) et à leur composition en monomères (Caboche *et al.*, 2010). Les diverses activités biologiques ont été classées en 5 (Schwarzer *et al.*, 2003) ou 6 groupes (Caboche *et al.*, 2010) (Figure 4).

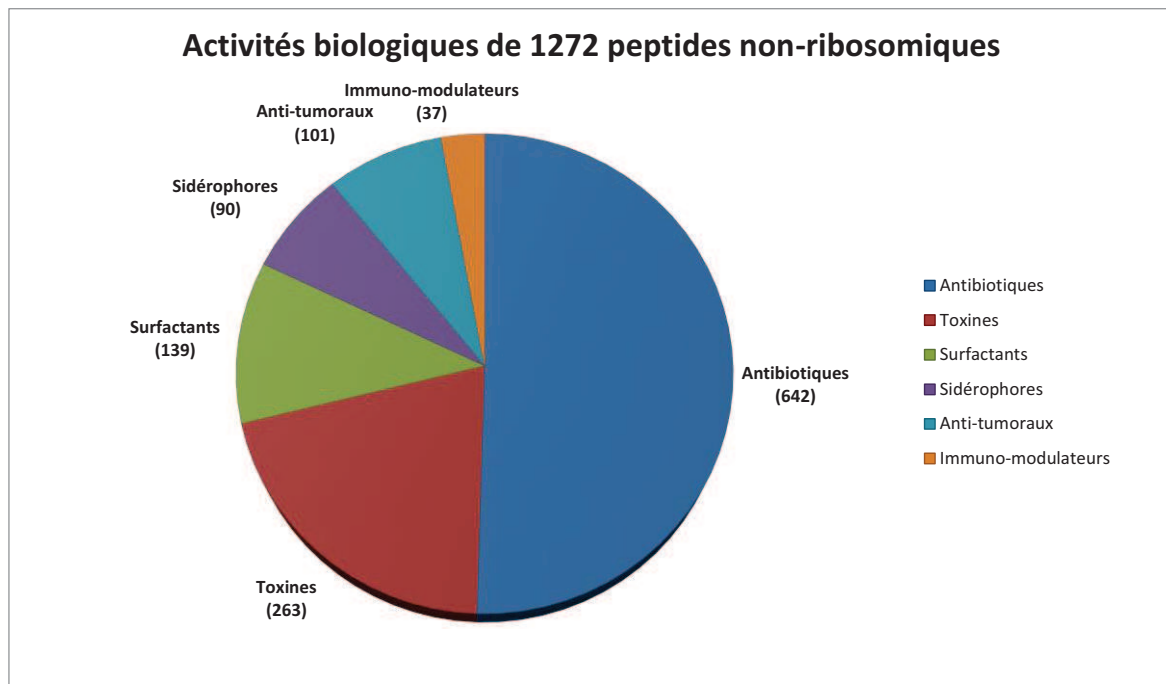


Figure 4 : Répartition des 6 classes d'activités biologiques de 1272 peptides non-ribosomiques recensés dans la base de données Norine.

La moitié des peptides référencés possèdent une activité antibiotique. Cependant certains de ces peptides peuvent avoir plusieurs activités biologiques différentes. (http://bioinfo.lifl.fr/norine/graph_peptides.jsp).

- **Les antibiotiques**

La majorité des peptides référencés dans la base de données Norine ont une activité antibiotique (642 sur 1272) au sens large puisqu'elle inclut également les antifongiques et les antiviraux (Figure 4). Comme exemple on peut citer la vancomycine, glycopeptide produit par *Amycolatopsis orientalis* (McCormick *et al.*, 1955), la tyrocidine A (Marahiel *et al.*, 1997), la gramicidine S (Byford *et al.*, 1997) ou encore la fengycine (Zhao *et al.*, 2013).

- **Les toxines**

Les peptides non-ribosomiques peuvent être des toxines comme la syringomycine synthétisée par *Pseudomonas syringae* (Scholz-Schroeder *et al.*, 2001) et les microcystines produites par les cyanobactéries (Lam *et al.*, 2000).

- **Les surfactants**

Les surfactants modifient la tension d'un liquide en formant un film à sa surface. Ils sont constitués d'une partie hydrophile et d'un acide gras hydrophobe. Les lipopeptides amphiphiles

tels que la surfactine produite par *Bacillus subtilis* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008) et la lichenysine produite par *Bacillus licheniformis* (Grangemard *et al.*, 2001) font aussi partie des peptides non-ribosomiques.

- **Les sidérophores**

Les sidérophores sont des chélateurs sécrétés par les microorganismes pour capter le fer nécessaire à leur survie lorsqu'ils sont dans un environnement pauvre en fer. Les sidérophores les plus connus sont les pyoverdines produites par différentes espèces de *Pseudomonas* (Budzikiewicz, 2004).

- **Les anti-tumoraux**

Les anti-tumoraux sont utilisés dans le traitement de certains cancers pour détruire les tumeurs. La bléomycine A2 produite par *Streptomyces verticillus* (Shen *et al.*, 2001) est utilisée dans le traitement du cancer de l'œsophage, des lymphomes, des carcinomes ou du cancer des testicules. Notons que la plupart des anti-tumoraux produits par les microorganismes ont souvent d'autres activités, car cette activité n'est pas celle qui est recherchée par les microorganismes qui produisent ces peptides.

- **Les immuno-modulateurs**

Ce sont des molécules qui inhibent ou activent le système immunitaire. Le plus connu des immuno-modulateurs est la cyclosporine A produite par *Tolypocladium inflatum*. (Dreyfuss *et al.*, 1976). Elle est utilisée pour réduire les phénomènes de rejet des greffes ou dans le traitement des maladies auto-immunes.

III LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE NON-RIBOSOMIQUE

.III.1 Mécanisme de synthèse

Les Non-Ribosomal Peptide Synthétase (NRPS) sont de grands complexes multienzymatiques organisés en modules permettant la production de peptides par voie non-ribosomique. Lors de la synthèse d'un peptide, plusieurs gènes codant pour des synthétases peuvent être impliqués. Ces gènes sont généralement organisés en opérons ou en « clusters » au niveau du génome (Schwarzer *et al.*, 2003). Une synthétase est composée de plusieurs modules, dont le nombre varie de 2 à une vingtaine (Stachelhaus & Marahiel, 1995). Chaque module est responsable de l'incorporation d'un monomère spécifique dans la chaîne peptidique en formation.

Les modules sont eux même subdivisés en domaines catalytiques responsables de l'activation du monomère (domaine d'adénylation A), de l'élongation de la chaîne peptidique (domaine de thiolation T), de la formation des liaisons peptidiques (domaine de condensation C) et de la libération du peptide (domaine thioestérase Te) (Sieber *et al.*, 2005). À la différence des autres domaines qui sont présents de manière répétitive, le domaine Te n'est présent que dans le module de terminaison (Dohren *et al.*, 1997 ; Marahiel & Essen, 2009 ; Strieker *et al.*, 2010).

.III.2 Structure modulaire des NRPS

Les modules sont classés en trois catégories : les modules d'initiation, d'élongation et de terminaison (Figure 5). Une synthétase débute par un module d'initiation qui contient au minimum un domaine d'adénylation (A) et un domaine de thiolation (T). Ensuite cette synthétase comporte des modules d'élongation qui contiennent au minimum un domaine de condensation (C), un domaine A et un domaine T (Lautru & Challis, 2004). Elle se termine par un module de terminaison qui comprend en plus des domaines C, A et T un domaine thioestérase (Te) (Schwarzer *et al.*, 2003, Finking & Marahiel, 2004).

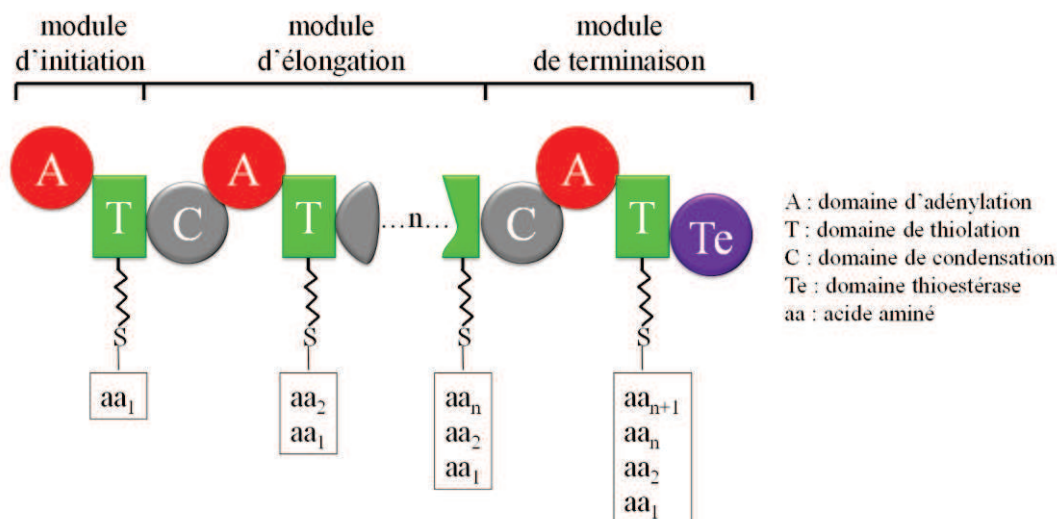


Figure 5 : Structure modulaire des NRPS avec les domaines de base pour l'initiation, l'élongation et la terminaison (adapté de Strieker *et al.*, 2010).

.III.3 Structure en domaines catalytiques

Des unités enzymatiques appelées domaines sont retrouvées à l'intérieur de chaque module. Ils sont impliqués dans l'incorporation ou la modification des acides aminés lors de la synthèse peptidique. Les domaines sont classés en deux catégories : les domaines principaux et les domaines secondaires.

.III.3.1 Les domaines principaux

Aussi appelés domaines essentiels, les domaines principaux sont indispensables pour le fonctionnement d'une synthétase. Ces domaines sont : les domaines d'adénylation, de thiolation, de condensation et de thioestérase.

.III.3.1.1 Le domaine d'adénylation (A)

Le domaine d'adénylation (A) est responsable de la reconnaissance et de l'activation des monomères spécifiques incorporés dans le peptide. Il est composé d'environ 550 acides aminés. Il sélectionne un acide aminé approprié parmi les options de substrats disponibles et l'active en aminoacyl adénylate (Dieckmann *et al.*, 1995 ; Stachelhaus & Marahiel, 1995 ; Mootz & Marahiel, 1997 ; May *et al.*, 2002). C'est la première étape de la biosynthèse non-ribosomique. L'activation du monomère se fait en hydrolysant une molécule d'ATP et en présence de Mg^{2+} (Figure 6).

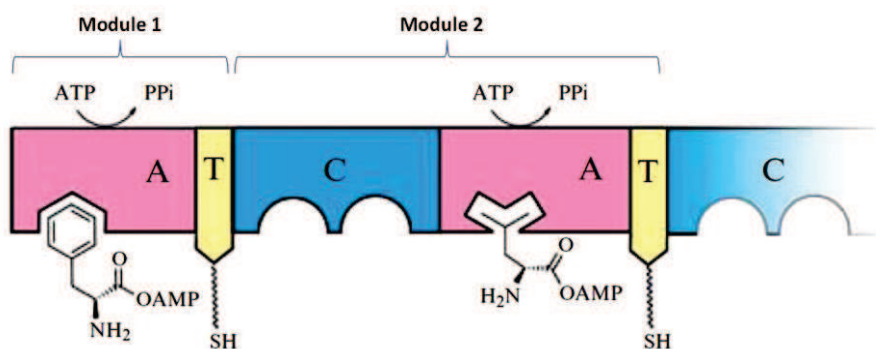


Figure 6 : Réaction d'activation de deux monomères sélectionnés par les domaines A en aminoacyl-O-AMP (Bachmann & Ravel, 2009).

Chaque réaction nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP et provoque la libération d'un pyrophosphate (PPi).

La spécificité des domaines d'adénylation et leur disposition le long de la chaîne d'assemblage NRPS détermine la composition du peptide (Finking & Marahiel, 2004). L'étude de la spécificité de ces domaines a été facilitée grâce à la détermination de la structure cristallographique du domaine A activant la phénylalanine (PheA) durant la synthèse de la gramicidine S chez *Bacillus brevis* (Conti *et al.*, 1997). C'est en 1997 que Conti *et al* ont identifié que 10 acides aminés du site actif (aussi appelé « binding pocket ») étaient importants dans la reconnaissance, la sélection et l'activation du substrat (Figure 7). Durant la même année, Marahiel *et al* ont mis en évidence des régions fortement conservées caractéristiques de chaque domaine. Ce travail a été rendu possible grâce à la comparaison de séquences protéiques de plusieurs domaines NRPS (domaines d'adénylation, de condensation, d'épimérisation, de N-méthylation, de thiolation et de thioestérase) (Marahiel *et al.*, 1997). Ces régions conservées sont appelés signatures des domaines ou « core motif ».

Le domaine d'adénylation contient 10 motifs conservés notés A1 à A10 contenant des séquences d'acides aminés qui jouent un rôle important dans la fonction du domaine (Tableau 1).

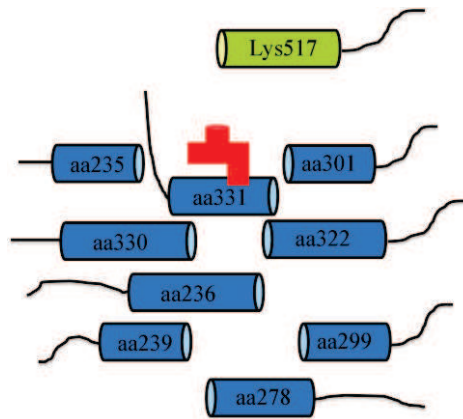


Figure 7 : Représentation des 10 acides aminés impliqués dans le site de fixation du substrat au sein d'un domaine d'adénylation (adapté de Stachelhaus *et al.*, 1999).

En bleu et vert les 10 acides aminés au sein du site de fixation du substrat qui est en rouge. Ces 10 acides aminés sont situés dans un rayon de 5,5 Å autour du substrat. Parmi ces acides aminés, la Lysine (Lys) en position 517 est toujours invariable car elle interagit avec l'AMP de l'adénylate.

Tableau 1 : Liste des motifs conservés caractéristiques des domaines impliqués dans la synthèse non-ribosomique (Marahiel *et al.*, 1997 ; Schwarzer *et al.*, 2003).

Domaines	Motifs	Séquence de la signature	Domaines	Motifs	Séquence de la signature
Domaine A	A1	L(TS)YxEL	Domaine E	E1	PIQxWF
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D		E2	HHxISDG(WV)S
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG		E3	DxLLxAxG
	A4	FDxS		E4	EGHGRE
	A5	NxYGPTE		E5	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	A6	GELxJGx(VL)ARGYL		E6	PxxGxGYG
	A7	Y(RK)TGDL		E7	FNYLG(QR)
	A8	GRxPxQVKIRGxRIELGEIE	Domaine Mt	M1	VL(DE)xGxGxG
	A9	LPxYM(IV)P		M2	NELSxYRYxAV
	A10	NGK(VL)DR		M3	VExSxARQxGxLD
Domaine T	T	LGG(DH)SL	Domaine Te	Te	GxSxG
Domaine C	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	Domaine Cy	Cy1	FPL(TS)xxQxAYxxGR
	C2	RHExLRTxF		Cy2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	C3	MHHxISDG(WV)S		Cy3	LPxxPxLPLxxxP
	C4	YxD(FY)AVW		Cy4	(TS)(PA)3x(LAF)6x(IVT)LxxW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR		Cy5	(GA)DFTxLxLL
	C6	(HN)QD(YD)PFE		Cy6	PVVFTSxL
	C7	RDxSRNPL		Cy7	(ST)(QR)TPQVx(LI)D13xWD
Domaine R	R1	V(L)(L)TG(A)TG(F)(L)GxxLL	Domaine Ox	Ox1	KYxYxSxGxxY(PG)VQ
	R2	Vx(L)(L)VR(A)		Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P
	R3	GPL(G)x(P)x(L)GL		Ox3	IxxxYG
	R4	V(Y)PYxYLxx(P)NVxxT			
	R5	GYxxSKW(A)(A)E			
	R6	R(P)G			
	R7	YxxxxG(LF)LxxP			

Dans un motif, la liste des acides aminés possibles à une position donnée est indiquée entre parenthèses. Le x symbolise n'importe quel acide aminé.

La position des 10 acides aminés précédemment identifiés par Conti *et al* dans le site de fixation du substrat a été localisée grâce à la structure cristallographique de PheA. Ces 10 acides aminés se trouvent dans un rayon de 5,5 Å autour du site de fixation du substrat (Figure 7 p. 37). Ils forment un code conférant la spécificité des domaines A (Stachelhaus *et al.*, 1999 ; Challis *et al.*, 2000). Ce code est appelé « Specificity Confering Code » ou « code Stachelhaus » du nom de son auteur ou encore code NRPS. Il contient les 10 acides aminés impliqués dans la sélection d'un substrat au niveau du domaine A et permet de prédire la spécificité des domaines A. Il est intégré dans de nombreux programmes d'annotation de NRPS qui prédisent les monomères sélectionnés.

En 2003, Schwarzer *et al* ont étendu la liste des motifs conservés aux domaines de cyclisation, d'oxydation et de réduction (Tableau 1). Ils ont aussi montré que 9 des 10 résidus d'acides aminés identifiés par Conti *et al* sont localisés entre les motifs A4 et A5 et que le dixième résidu se trouve en dehors de cette région (Schwarzer *et al.*, 2003).

En 2005, Rausch *et al* ont proposé une nouvelle méthode de prédiction des monomères sélectionnés par les domaines A (Rausch *et al.*, 2005). Cette dernière utilise une signature de 34 acides aminés situés dans un rayon de 8 Å autour du substrat. Le domaine A est donc déterminant pour prédire la composition en monomère du peptide produit par une synthétase. La sélection d'un monomère par ce domaine se fait donc en fonction de la composition des acides aminés présents à certaines positions du site actif.

.III.3.1.2 Le domaine de thiolation (T)

Le domaine de thiolation aussi appelé domaine PCP pour « Peptidyl Carrier Protein » est composé d'environ 80-100 acides aminés et représente l'unité de transport qui permet aux monomères activés de se déplacer entre les différents centres catalytiques (Linne *et al.*, 2000 & 2001). Ce domaine fixe de manière covalente l'aminoacyl adénylate préalablement activé par le domaine A sur la synthétase par l'intermédiaire d'une liaison thioester pour former un intermédiaire aminoacyl-thioester (Figure 8). Le transfert de l'aminoacyl adénylate au domaine T est effectué par un cofacteur 4'-Phosphopantéthéine (4'-Ppant) fixé sur un résidu sérine conservé (Stachelhaus *et al.*, 1996 ; Ehman *et al.*, 2000). L'activation du domaine T qui passe d'une forme inactive (apo) à une forme active (holo) contenant le cofacteur 4'-Ppant se fait grâce à la phosphopantéthéine transférase (Quadri *et al.*, 1998).

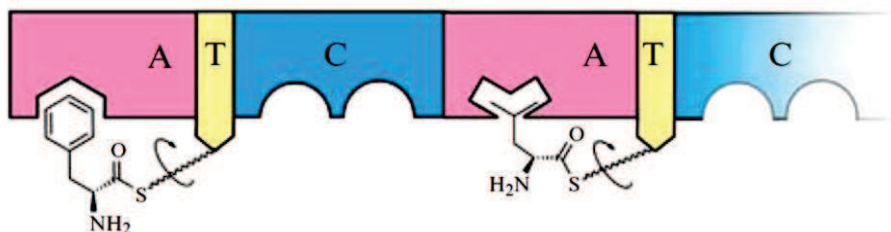


Figure 8 : Formation de deux aminoacyl-thioesters fixés aux domaines T (Bachmann & Ravel, 2009).

.III.3.1.3 Le domaine de condensation (C)

Le domaine de condensation (C) est composé d'environ 450 acides aminés et est toujours présent à l'extrémité N-terminal du module d'élongation. Il catalyse la formation de la liaison peptidique entre deux monomères adjacents portés chacun par un domaine de thiolation (Stachelhaus *et al.*, 1998 ; Bergendahl *et al.*, 2002). Le nombre de liaisons peptidiques dans un peptide entièrement assemblé est généralement égal au nombre de domaines C dans chaque synthétase (Stachelhaus *et al.*, 1998). Un modèle propose l'existence de 2 sites de liaison au substrat (Figure 9). Un site accepteur (a) qui lie l'acide aminé fixé au domaine T du module correspondant. Cet aminoacyl-thioester acceptera un peptide en croissance à partir du module précédent. Le site donneur (d) se lie à l'aminoacyl-thioester fixé au module précédent. Ainsi la liaison peptidique est formée par l'attaque nucléophile de l'acide aminé fixé sur le domaine T1 du module 1 par l'acide aminé fixé sur le domaine T2 du module 2. Le site accepteur a plus d'affinité pour l'acide aminé activé que le site donneur, c'est ainsi que la direction de la chaîne peptidique en croissance est maintenue (Mootz *et al.*, 2000 & 2002).

Des études biochimiques de nombreux domaines C ont démontré que le site accepteur présente une sélectivité à la fois sur la stéréochimie (isomère L ou D) et sur la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé à incorporer (Belshaw *et al.*, 1999 ; Ehmann *et al.*, 2000 ; Linne & Marahiel, 2000 ; Luo *et al.*, 2002). Par conséquent, en plus du domaine A, le domaine C agit comme une seconde ligne de sélection du substrat (Ehmann *et al.*, 2000 ; Lautru & Challis, 2004).

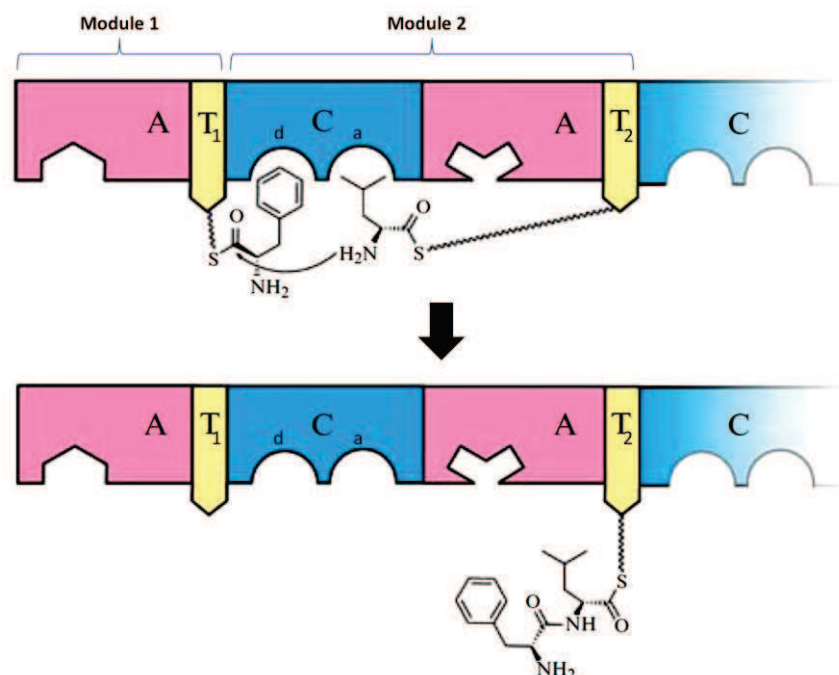


Figure 9 : Formation de la liaison peptidique entre deux substrats aminoacyl-thioester par le domaine C (Bachmann & Ravel, 2009).

Le domaine C contient un site accepteur (a) qui lie l'acide aminé fixé au domaine T du module correspondant (module 2) et un site donneur (d) qui lie à l'aminoacyl-thioester fixé au module précédent (module 1). Ainsi la liaison peptidique est formée par l'attaque nucléophile de l'acide aminé fixé sur le domaine T1 du module 1 par l'acide aminé fixé sur le domaine T2 du module 2

L'analyse phylogénétique des domaines C a révélé l'existence de plusieurs sous-familles de domaine C regroupées en fonction de leurs activités spécifiques (Roongsawang *et al.*, 2005 ; Rausch *et al.*, 2007 ; Ziemert & Jensen, 2012). On retrouve :

- La sous-famille $^L C_L$ qui catalyse la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés de forme L porté par deux modules adjacents (Clugston *et al.*, 2003).
- La sous-famille $^D C_L$ qui catalyse la formation d'une liaison peptidique entre un acide aminé de forme D et un autre de forme L (Clugston *et al.*, 2003). Elle est située après un domaine d'épimérisation.
- La sous-famille C/E « **dual condensation-épimérisation** » qui possède une double fonction d'épimérisation de l'acide aminé situé sur le premier module et de formation de la liaison peptidique. Dans ce cas le peptide produit contient des acides aminés D alors que la synthétase ne contient pas de domaine d'épimérisation. Elle a été identifiée

chez diverses NRPS produisant par exemple l'arthrofactine (Balibar *et al.*, 2005) ou encore la fusariscidine (Li & Jensen, 2007).

- La sous-famille **C_{Starter}** se trouve dans la partie N-terminal de la synthétase et intervient dans la liaison entre un acide gras en début de chaîne peptidique et un acide aminé sélectionné par le module d'initiation de la synthétase (Konz *et al.*, 1999 ; Rausch *et al.*, 2007). Or les domaines C ne sont normalement pas présents dans les modules d'initiations des NRPS. Ces domaines C_{Starter} sont retrouvés dans les lipopeptides et les chromodepsipeptides des actinomycètes comme les *Bacillus* et les *Pseudomonas* (Cosmina *et al.*, 1993 ; Guenzi *et al.*, 1998 ; Duitman *et al.*, 1999 ; Konz *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 1999 ; Tsuge *et al.*, 2001 ; Roongsawang *et al.*, 2003 ; Miao *et al.*, 2005 & 2006).

.III.3.1.4 Le domaine thioestérase (Te)

Le domaine thioestérase (Te) est généralement situé à l'extrémité C-terminal du module de terminaison de la synthétase (Schneider & Marahiel, 1998 ; Keating *et al.*, 2001). Il est composé d'environ 280 acides aminés. Il catalyse la libération du peptide néoformé soit par hydrolyse de la liaison thioester qui lie le peptide au domaine T du module de terminaison (Bruner *et al.*, 2002) pour former un peptide linéaire; soit par cyclisation intramoléculaire pour former un peptide cyclique ou partiellement (Figure 10) (Sieber & Marahiel, 2003).

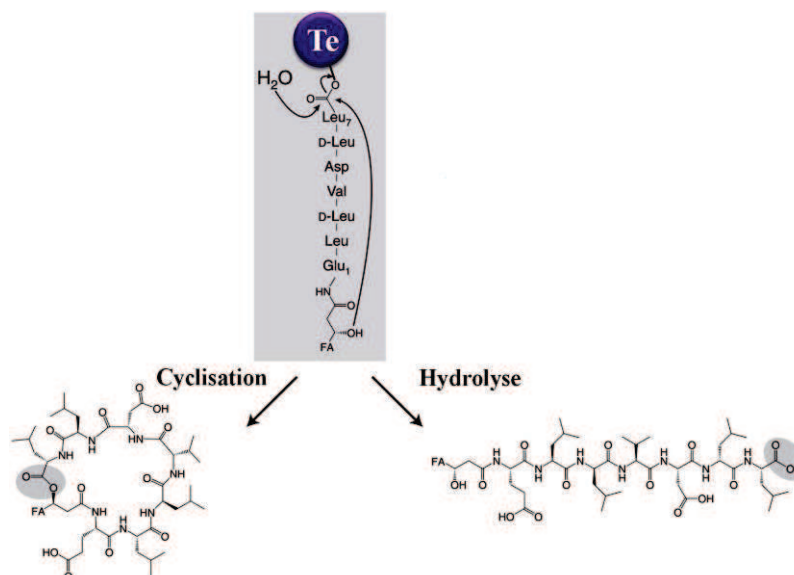


Figure 10 : Réaction d'hydrolyse et de cyclisation de la chaîne peptidique catalysée par le domaine thioestérase lors de l'assemblage de la surfactine (Sieber & Marahiel, 2003).

.III.3.2 Les domaines secondaires

En plus des domaines principaux qui sont indispensables pour la biosynthèse non-ribosomique, il existe des domaines secondaires responsables de modifications structurales supplémentaires des peptides (Walsh *et al.*, 2001 ; Schwarzer *et al.*, 2003 ; Fischbach & Walsh, 2006 ; Samel *et al.*, 2008). Ces modifications chimiques confèrent une plus grande rigidité structurale et une stabilité contre la dégradation protéolytique des peptides. Il existe différents domaines secondaires. Les plus courants sont les domaines d'épimérisation (E), de cyclisation (Cy), de méthylation (Mt), de formylation (F), d'oxydation (Ox) et de réduction (R) (Figure 11).

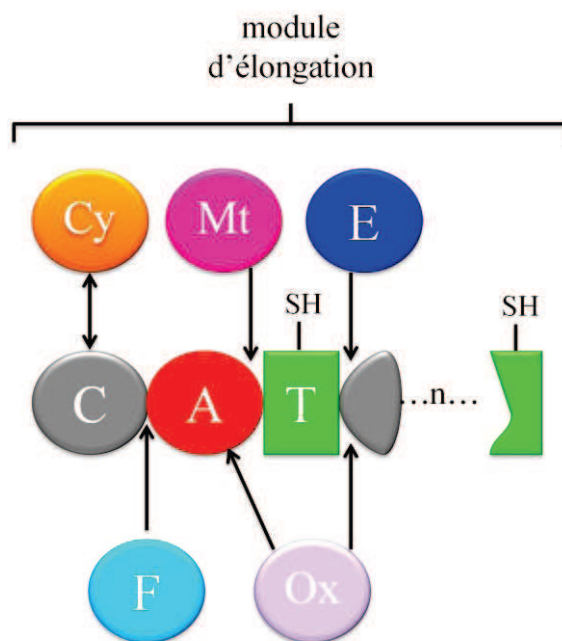


Figure 11 : Position des domaines secondaires dans un module d'élongation (adapté de Lautru & Chalis, 2004 ; Fischbach & Walch, 2005).

F = domaine de formylation ; Ox = domaine d'oxydation ; Cy = domaine de cyclisation ; Mt = domaine de méthylation ; E = d'épimérisation. Le domaine Cy remplace le domaine de condensation (C) dans certaines synthétases. Le domaine Mt est localisé après un domaine A. Le domaine E est localisé entre les domaines T et C. Le domaine F est localisé avant un domaine A. Le domaine Ox est soit enchâssé dans un domaine A ou localisé après un domaine T.

.III.3.2.1 Le domaine d'épimérisation (E)

C'est le plus répandu des domaines secondaires. Il est composé de 450 acides aminés et est localisé entre les domaines T et C. Les peptides non-ribosomiques possèdent souvent dans leurs

structures des acides aminés de type D. Ces acides aminés peuvent être incorporés directement dans les peptides après activation par des domaines d'adénylation spécifiques. Ils peuvent aussi être obtenus par la conversion d'un acide aminé L déjà incorporé en son isomère D grâce au domaine d'épimérisation (Figure 12). Cette conversion stéréochimique est catalysée par le domaine E (Stachelhaus & Walsh, 2000). Les domaines E peuvent catalyser la réaction d'épimérisation soit avant, soit après la formation de la liaison peptidique. S'ils sont situés dans un module d'initiation, ils catalysent généralement l'épimérisation avant la condensation des acides aminés et s'ils sont situés dans un module d'élongation, ils catalysent l'épimérisation après la formation de la liaison peptidique (Luo *et al.*, 2002).

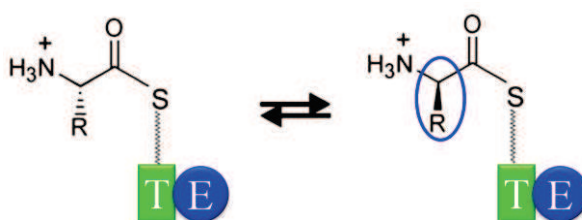


Figure 12 : Réaction d'épimérisation de l'acide aminé fixé sur le domaine T catalysée par le domaine E (Schwarzer *et al.*, 2003).

.III.3.2.2 Le domaine de cyclisation (Cy)

Le domaine Cy présente une très forte homologie de séquence avec les domaines de condensation (C). Il catalyse à la fois des réactions de condensation et de cyclisation (Challis & Naismith, 2004). Dans certaines synthétases le domaine Cy remplace le domaine C (Lautru & Challis, 2004). Il catalyse la formation de petits hétérocycles obtenus par cyclisation de la chaîne latérale de la cystéine, la sérine ou la thréonine avec la chaîne peptidique principale (Figure 13). Le produit de cette cyclisation est un noyau thiazoline si une cystéine est impliquée ; ou un noyau oxazoline s'il s'agit d'une sérine ou d'une thréonine (Gehring *et al.*, 1998 ; Walsh *et al.*, 2001 ; Duerfahrt *et al.*, 2004). Ces hétérocycles améliorent la diversité structurelle et la rigidité des peptides non-ribosomiques et sont importants pour la chélation des métaux et l'interaction avec les protéines, l'ADN ou l'ARN (Roy *et al.*, 1999 ; Duerfahrt *et al.*, 2004). Ainsi les peptides contenant un noyau hétérocyclique ont une grande importance dans le domaine pharmacologique. Ce sont par exemple des antibiotiques comme la bacitracine (Ikai, 1992) et des agents anti-tumoraux comme la bléomycine (Takita *et al.*, 1978) et l'épothilone (Gerth *et al.*, 1996). Par conséquent, les domaines Cy représentent un outil intéressant pour

l'ingénierie des NRPS hybrides et la conception de composés nouveaux contenant des noyaux hétérocycliques.

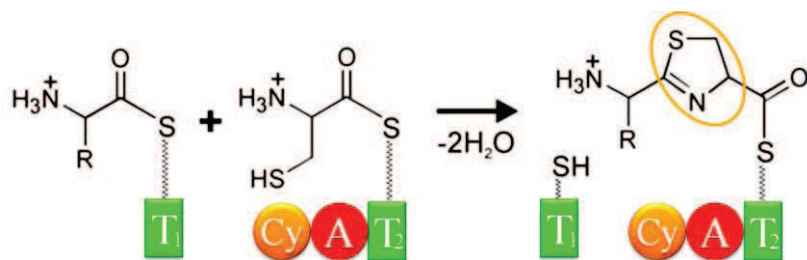


Figure 13 : Réaction de cyclisation catalysée par le domaine Cy entre deux acides aminés fixés sur deux domaines T de modules adjacents (T1 et T2) (Schwarzer *et al.*, 2003).

Le domaine de cyclisation (Cy) forme un noyau thiazoline à partir de la cystéine liée au domaine T2 et de l'acide aminé fixé au domaine T1.

.III.3.2.3 Les domaines d'oxydation (Ox) et de réduction (R)

L'état d'oxydation des hétérocycles peut être modifié dans les peptides non-ribosomiques grâce à des domaines d'oxydation ou de réduction. Ces domaines agissent après le domaine de cyclisation.

Le domaine Ox est impliqué dans l'oxydation des cycles thiazolines et oxazolines formés par le domaine Cy en cycles thiazoles et oxazoles respectivement sous l'action de la flavine mononucléotide (FMN) comme cofacteur (Du *et al.*, 2000) (Figure 14). La position de ce domaine varie selon les enzymes. Dans la synthétase EpoB de l'épothilone, le domaine Ox est enchâssé dans le domaine A, formant un module « Cy-A-Ox-A-T ». Dans la synthétase BlmIII de la bléomycine, ce domaine Ox est localisé après le domaine T (Schneider *et al.*, 2003).

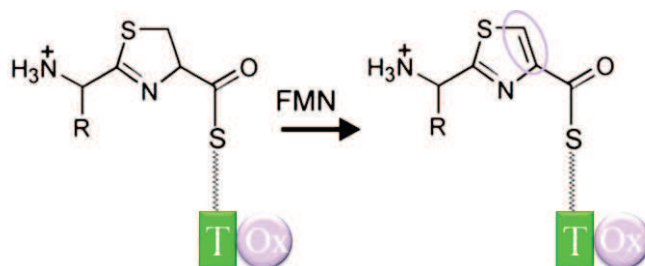


Figure 14 : Réaction d'oxydation de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer *et al.*, 2003).

Le domaine de réduction (R) catalyse la réduction de la thiazoline en thiazolidine ou l'oxazoline en oxazolidine grâce au cofacteur NADPH (Figure 15). Ce domaine est peu

fréquent, il est retrouvé dans les synthétases de la yersiniabactine et de la pyochéline (Finking & Marahiel, 2004).

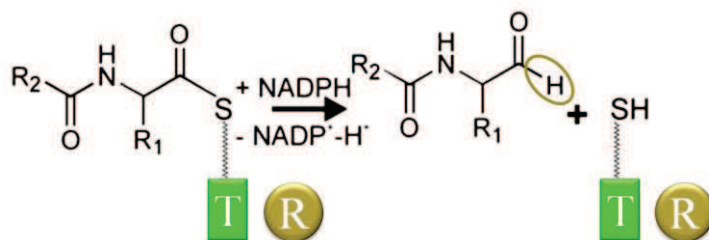


Figure 15 : Réaction de réduction de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer *et al.*, 2003).

.III.3.2.4 Le domaine de méthylation (Mt)

Les acides aminés méthylés sont très fréquents dans les peptides non-ribosomiques. Ces méthylations sont catalysées par le domaine Mt (Figure 16). Il est généralement intégré à l'extrémité C-terminale du domaine A responsable de l'activation de l'acide aminé méthylé (Grunewald & Marahiel, 2006). Il existe deux types de méthylation : une N-méthylation effectuée par les N-méthyltransférases qui ajoutent un groupement méthyle (CH_3) à l'atome d'azote de l'acide aminé et une C-méthylation effectuée par les C-méthyltransférases qui ajoutent un groupement méthyle sur un noyau thiazole. La N-méthylation se fait par l'intermédiaire du coenzyme S-adenosyl méthionine (SAM) (Hacker *et al.*, 2000). Par exemple, la cyclosporine A contient 7 acides aminés N-méthylés sur ces 11 monomères (Schwarzer *et al.*, 2003).



Figure 16 : Réaction de méthylation de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer *et al.*, 2003).

.III.3.2.5 Le domaine de formylation (F)

Le domaine F catalyse le transfert d'un groupement formyle à partir du cofacteur N^{10} -formyl-tétrahydrofolate (N^{10} -THF) sur l'atome d'azote d'un acide aminé (Schwarzer *et al.*

al., 2003). Ce domaine est en général situé à l'extrémité N-terminale d'un domaine A (Figure 17). La formylation des peptides non-ribosomiques a été signalée dans la gramicidine linéaire produite par *Bacillus brevis* ATCC 8185 (Schoenafinger *et al.*, 2006) et dans l'anabaenopeptilide 90-A produite par la souche *Anabaena* 90 (Rouhiainen *et al.*, 2000).

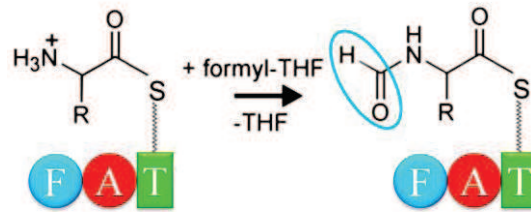


Figure 17 : Réaction de formylation de l'acide aminé fixé sur le domaine T (Schwarzer *et al.*, 2003).

Le Tableau 1 p. 37 reprend la liste des motifs conservés et leur séquence protéiques au sein des différents domaines principaux et secondaires cités ci-dessus.

.III.4 Modes de biosynthèses

Le mode d'assemblage des monomères permet de définir trois types de biosynthèses (Mootz *et al.*, 2002). La première et la plus fréquente est la biosynthèse linéaire (type A). Dans cette biosynthèse il y'a une colinéarité entre le nombre et l'ordre des modules de la synthétase et le nombre de monomères incorporés dans le peptide. En d'autre terme l'assemblage des monomères se fait suivant l'ordre d'activation, ce qui fait qu'une synthétase à « n » modules va assembler un peptide à « n » acides aminés. La cyclosporine A, le tripeptide ACV précurseur de la pénicilline et de la céphalosporine (Smith *et al.*, 1990), ou encore la surfactine (Peypoux *et al.*, 1999) sont synthétisés de façon linéaire (Figure 18).

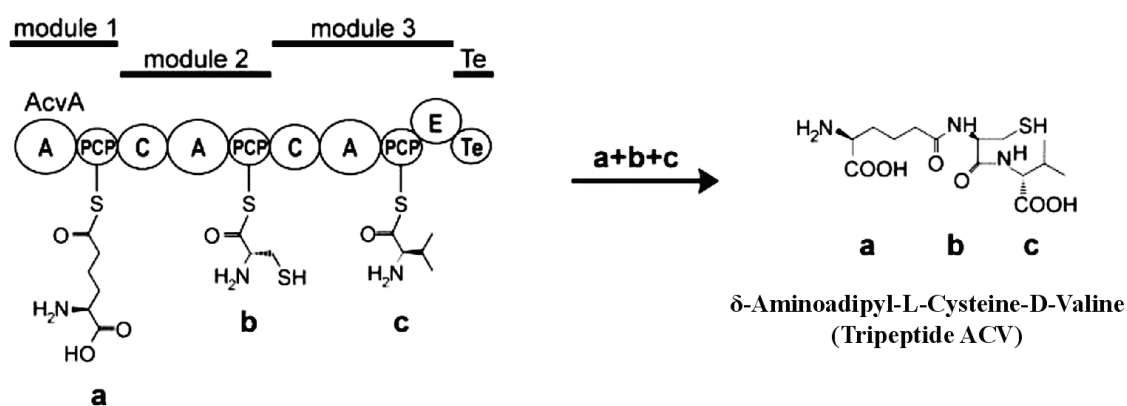


Figure 18 : Biosynthèse linéaire (type A) de l'ACV (Mootz *et al.*, 2002).

La synthétase de L'ACV est composée de 10 domaines organisés en 3 modules. L'enchaînement des monomères a, b et c incorporés dans le peptide final correspond à celui des modules 1, 2 et 3 de la synthétase. Chaque module incorpore un monomère reconnu par les domaines d'adénylation. Le peptide formé est libéré par le domaine Te. La synthétase possède un domaine secondaire, le domaine d'épimérisation (E) qui modifie l'isomérisation du monomère c porté par le module 3.

Le second mode rencontré est la biosynthèse itérative (type B). Comme son nom l'indique, dans cette biosynthèse les modules ou domaines de la synthétase peuvent être utilisés plus d'une fois lors de l'assemblage d'un même peptide. Elle conduit à la formation d'un peptide contenant des motifs répétés dont le nombre sera supérieur au nombre de modules de la synthétase. C'est le cas des synthétases de la gramicidine S (Kohli *et al.*, 2001) et de l'entérobactine (Gehring *et al.*, 1998). La Figure 19 montre le mécanisme de synthèse de l'entérobactine, un sidérophore produit par *E. coli* lors d'une carence en fer.

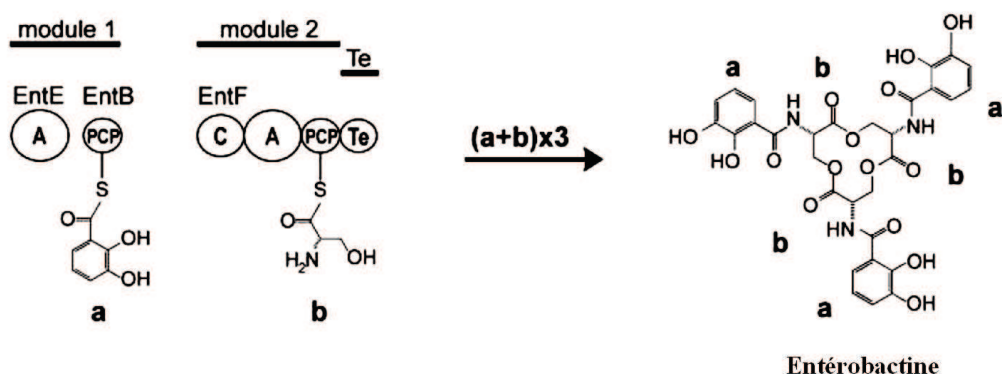


Figure 19 : Biosynthèse itérative (type B) de l'entérobactine (Mootz *et al.*, 2002).

L'opéron de l'entérobactine code pour 3 synthétases (EntE, B et F) regroupées en 2 modules. Chaque module incorpore un monomère pour former un dipeptide. L'assemblage $(a+b) \times 3$ de ces monomères conduit à la molécule finale d'entérobactine.

Le dernier mode rencontré est la biosynthèse non linéaire (type C). Elle est caractérisée par un agencement différent des domaines par rapport à l'agencement classique (C-A-T), ou une incorporation de petites molécules provenant d'une autre voie de synthèse. Contrairement à la biosynthèse linéaire, cette voie peut mener à des cyclisations internes ou à des branchements dans le peptide final (Mootz *et al.*, 2002). L'exemple de molécule la plus courante synthétisée par cette voie est la vibriobactine (Keating *et al.*, 2000) (Figure 20).

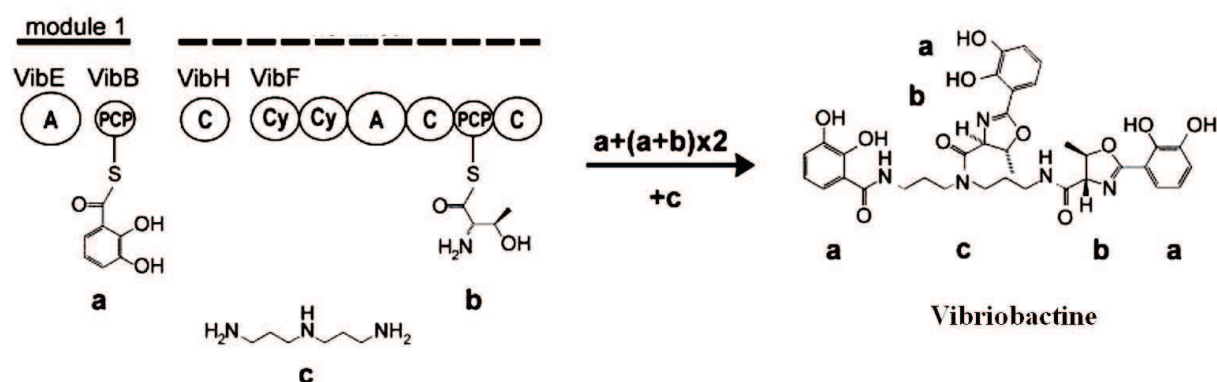


Figure 20 : Biosynthèse non linéaire (type C) de la vibriobactine (Mootz *et al.*, 2002).

La synthétase de la vibriobactine est composée de 4 protéines (VibE, B, H et F) dont les trois premières sont des domaines isolés. La molécule est synthétisée à partir de répétitions de monomères (a et b) et d'une molécule de norspermidine (c) qui provient d'une autre voie de synthèse.

Les NRPS peuvent aussi produire différents variants d'un peptide qui ont la même structure avec des acides aminés variables à certaines positions. Il a été montré que les changements de milieu nutritifs peuvent conduire à la production de plus de 30 variants de la cyclosporine (von Döhren *et al.*, 1997). Dans d'autres cas, la synthèse des variants est due à une diversité de séquences génomiques. Par exemple, il a été montré que la séquence de la synthétase produisant la bacillomycine D (Moyne *et al.*, 2004) est différente de celle produisant la bacillomycine L (Hofemeister *et al.*, 2004) dans des souches différentes.

IV ANTIBIOTIQUES PRODUITS PAR LES *PAENIBACILLI*

.IV.1 Généralités

Les souches de *Paenibacillus polymyxa* sont connues pour leur production de peptides antimicrobiens (Storm *et al.*, 1977). Ces souches anciennement appelées « *Bacillus polymyxa* » ont été renommées *P. polymyxa* en 1993 (Ash *et al.*, 1993). Entre 1947 et 1948 trois équipes ont découvert simultanément que ces souches produisaient une substance antibiotique, la polymyxine (Benedict & Stodola, 1949 ; Stansly, 1949). Par ailleurs, différents travaux ont révélé que les *P. polymyxa* pouvaient produire de nombreux autres peptides antibiotiques. Ces peptides peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur spectre d'activité antimicrobienne.

- Le premier groupe comprend les composés ayant une activité antibiotique contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif (Tableau 2). Parmi ces composés on retrouve les polymyxines, les polypeptides, les jolipeptides, la gavaserine, la saltavaline, la polyxine et les bactériocines de la classe IIa.

Tableau 2 : Caractéristiques des peptides antimicrobiens du premier groupe.

Nom	Masse moléculaire (Da)	Référence
Polymyxines	1300	Katz & Demain, 1977 Hermesen <i>et al.</i> , 2003 Martin <i>et al.</i> , 2003
Polypeptides	1100 - 1200	Takeuchi <i>et al.</i> , 1979 Li <i>et al.</i> , 2007a
Polyxine	10000	Piuri <i>et al.</i> , 1998
Gavaserine	911	Pichard <i>et al.</i> , 1995
Saltavaline	903	Pichard <i>et al.</i> , 1995
Jolipeptides	1013*	Ito & Koyama 1972a & 1972b
Bactériocines de classe 2a	3500	Dridet <i>et al.</i> , 2006 Svetoch <i>et al.</i> , 2005

* estimation effectuée d'après la composition en acides aminés donnée par Ito & Koyama.

- Le deuxième groupe comprend les composés ayant une activité antibiotique principalement orientée contre les bactéries à Gram-positif et les moisissures (Tableau 3). Ce groupe comprend les fusaricidines (A, B, C et D), la gatavaline et les composées antifongiques de types LI-F. La gatavaline aurait une structure proche des polymyxines et ne serait active que

sur les bactéries à Gram positif. Un autre composé appelé paénibacilline (He *et al.*, 2007) a été découvert. La paénibacilline n'est active que sur les bactéries à Gram positif. Bien que sa structure ne soit pas encore entièrement élucidée, la paenibacilline serait proche des lantibiotiques, molécules antibiotiques produites par certains *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* et *Streptomyces sp.* (Nagao *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Caractéristiques des peptides antimicrobiens du second groupe.

Nom	Masse moléculaire (Da)	Références
Fusaricidines	883 - 961	Kajimura & Kaneda, 1996 & 1997
Gatavoline	>3500	Nakajima <i>et al.</i> , 1972
LI-F	883 - 961	Kurusu <i>et al.</i> , 1987
Paenibacilline	2983,54	He <i>et al.</i> , 2007

La littérature rapporte qu'il existe beaucoup d'autres composés antibactériens et antifongiques produits par des souches de *P. polymyxa* qui ne sont pas encore formellement caractérisés (Mavingui & Heulin, 1994 ; Liang *et al.*, 1996 ; Dijksterhuis *et al.*, 1999 ; He *et al.*, 2007). Par exemple Rosado & Seldin (1993) ont découvert un composé de 3500 Da actif contre la plupart des bactéries à Gram-positif mais n'ayant pas d'activité contre *Pa.* Un autre peptide de 2983 Da a été décrit par He *et al.* (2007) comme étant un nouvel antibiotique à forte activité contre des bactéries à Gram-positif pathogènes d'origine alimentaire.

Des études récentes ont montré que de nombreuses souches de *Paenibacillus* appartenant à des espèces autres que *polymyxa* pouvaient aussi produire des peptides antimicrobiens. Par exemple, des activités antimicrobiennes ont été rapportées chez les espèces *thiaminolyticus* (Huang *et al.*, 2014), *profundus* (Kalinovskaya *et al.*, 2013), *tianmuensis* (Qian *et al.*, 2012), *elgii* (Wu *et al.*, 2010), *ehimensis* (Huang *et al.*, 2013), *burgondia* (Selim *et al.*, 2005), *validus*, *azotofixans*, *chibensis*, *brasiliensis*, *peoriae* (Lorentz *et al.*, 2006 ; Weid *et al.*, 2003), *alvei* (Chevrot *et al.*, 2013), et *kobensis* (Martin *et al.*, 2003).

Des travaux antérieurs effectués par notre équipe ont permis d'isoler deux souches de *Paenibacillus* : l'une de l'environnement (*Paenibacillus* B-LR) et l'autre d'une expectoration d'un patient atteint de Mucoviscidose (*Paenibacillus* 32). Il a ensuite été montré que les *Paenibacillus* B-LR et 32 produisaient des molécules antibiotiques proches des polymyxines et des fusaricidines. Ces deux souches faisant l'objet de notre étude, nous allons nous intéresser à ces deux familles de molécules.

Polymyxines	Pos 3	Pos 6	Pos 7	Acide gras (AG)	Masse (Da)	Formule brute
Polymyxine A (Aerosporine)						
A ₁	D-Dab	D-Leu	L-Thr	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1157,57	C ₅₁ H ₉₇ N ₁₆ O ₁₄
A ₂	D-Dab	D-Leu	L-Thr	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	-	C ₅₀ H ₉₅ N ₁₆ O ₁₄
Polymyxine B						
B ₁	L-Dab	D-Phe	L-Leu	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1202,7498	C ₅₆ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
Ile-B ₁	L-Dab	D-Phe	L-Ile	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1202,7498	C ₅₆ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
B ₂	L-Dab	D-Phe	L-Leu	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	1188,7342	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
B ₃	L-Dab	D-Phe	L-Leu	OA (C ₈ H ₁₅ O)	1188,7342	C ₅₅ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
B ₄	L-Dab	D-Phe	L-Leu	HA (C ₇ H ₁₃ O)	1174,7185	C ₅₄ H ₉₄ N ₁₆ O ₁₃
B ₅	L-Dab	D-Phe	L-Leu	NA (C ₉ H ₁₇ O)	1202,7498	C ₅₆ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
B ₆	L-Dab	D-Phe	L-Leu	3-OH-6-MOA (C ₉ H ₁₇ O ₂)	1218,1447	C ₅₆ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₄
Polymyxine C						
C	L-Dab	D-Phe	L-Thr	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	-	-
Polymyxine D						
D ₁	D-Ser	D-Leu	L-Thr	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1143	-
D ₂	D-Ser	D-Leu	L-Thr	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	1129	-
Polymyxine E (Colistine)						
E ₁	L-Dab	D-Leu	L-Leu	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1168,7655	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃
E ₂	L-Dab	D-Leu	L-Leu	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	1154,7498	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
E ₃	L-Dab	D-Leu	L-Leu	OA (C ₈ H ₁₅ O)	1154,7498	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
E ₄	L-Dab	D-Leu	L-Leu	HA (C ₇ H ₁₃ O)	1140,7342	C ₅₁ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
E ₇	L-Dab	D-Leu	L-Leu	7-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1168,7655	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃
Ile-E ₁	L-Dab	D-Leu	L-Ile	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1168,7655	C ₅₃ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₁₃
Ile-E ₂	L-Dab	D-Leu	L-Ile	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	1154,7498	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
Ile-E ₈	L-Dab	D-Leu	L-Ile	7-MNA (C ₁₀ H ₁₉ O)	1182,7811	C ₅₄ H ₁₀₂ N ₁₆ O ₁₃
Nval-E ₁	L-Dab	D-Leu	L-Nval	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1140,7342	C ₅₁ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
Val-E ₁	L-Dab	D-Leu	L-Val	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1154,7498	C ₅₂ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₃
Val-E ₂	L-Dab	D-Leu	L-Val	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	1140,7342	C ₅₁ H ₉₆ N ₁₆ O ₁₃
Polymyxine M (Mattacine)						
M	L-Dab	D-Leu	L-Thr	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1157,7370	C ₅₁ H ₉₇ N ₁₆ O ₁₄
Polymyxine P						
P ₁	D-Dab	D-Phe	L-Thr	6-MOA (C ₉ H ₁₇ O)	1191,90	-
P ₂	D-Dab	D-Phe	L-Thr	6-MHA (C ₈ H ₁₅ O)	1177,90	-

Figure 21 : Structure chimique des différents groupes de polymyxines.

Pos = position des acides aminés 3, 6 et 7. AG = acide gras. DAB = acide α , γ -diaminobutyrique. Nval = Norvaline. 6-MOA = acide-6-méthyl-octanoïque (C₉H₁₇O). 6-MHA = acide-6-méthyl-heptanoïque (C₈H₁₅O). OA = acide octanoïque (C₈H₁₅O). HA = acide heptanoïque (C₇H₁₃O). NA = acide nonanoïque (C₉H₁₇O) et 3-OH-6-MOA = acide-3-hydroxy-6-méthyl-octanoïque (C₉H₁₇O₂) d'après (Stansly 1949 ; Newton 1956 ; Vogler & Studer, 1966 ; Wilkinson & Lowe, 1966 ; Parker & Rathnum, 1975 ; Orwa *et al.*, 2001 ; Govaerts *et al.*, 2002a ; Govaerts *et al.*, 2002b ; Martin *et al.*, 2003 ; Niu *et al.*, 2013).

.IV.2 Les polymyxines

.IV.2.1 Bactéries productrices

Depuis la découverte de la polymyxine B en 1947 chez *B. polymyxa*, une quinzaine d'autres formes de polymyxines ont été caractérisées chez différentes espèces bactériennes. La polymyxine E est produite par les souches *B. colistinus* (Evans *et al.*, 1999), *Paenibacillus amylolyticus* (DeCrescenzo *et al.*, 2007), *P. polymyxa* OSY-DF (He *et al.*, 2007), *P. polymyxa* JB05-01-1 (Naghmouchi *et al.*, 2011) et *P. polymyxa* ATCC21830 (Park *et al.*, 2012). La polymyxine M est produite par *P. kobensis* (Martin *et al.*, 2003). La polymyxine B est produite par *P. polymyxa* PKB1 (Shaheen *et al.*, 2011), *P. polymyxa* JSa-9 (Deng *et al.*, 2011) et *P. polymyxa* F4 (Park *et al.*, 2012). La polymyxine A par *P. polymyxa* E681 (Choi *et al.*, 2009) et récemment la polymyxine P est produite par *P. polymyxa* M-1 (Niu *et al.*, 2013). Ces souches de *P. polymyxa* sont en général isolées du sol, de la rhizosphère, de l'eau, des larves d'insectes malades ou encore des aliments (Choi *et al.*, 2009).

.IV.2.2 Structure chimique

Les polymyxines sont des lipopeptides antibiotiques qui constituent un groupe de 7 polypeptides nommés polymyxine A, B, C, D, E, M et P (Stansly 1949 ; Martin *et al.*, 2003 ; Niu *et al.*, 2013). La polymyxine E est également connue sous le nom de colistine, la polymyxine A sous le nom d'aerosporine et la polymyxine M sous le nom de mattacine. La structure de base des polymyxines est constituée d'un heptapeptide cationique cyclique substitué par un tripeptide lié à un acide gras du côté N-terminal par une liaison amide (Figure 21 p. 52) (Katz & Demain, 1977). Chaque groupe de polymyxine est divisé en plusieurs sous-groupes principalement basés sur les variations de la chaîne latérale « acide gras ». Toutes les polymyxines ont une structure de base commune (Figure 21 p. 52). Elles se distinguent les unes des autres par des différences aux niveaux des acides aminés ou de la composition en acide gras (Orwa *et al.*, 2002). La plupart des variations sont observées sur les acides aminés en position 3, 6 et 7 (Storm *et al.*, 1977).

L'acide 2,4-diaminobutyrique (Dab) est un monomère présent en grande quantité dans les polymyxines (6 résidus Dab dans chaque molécule). Dans chaque polymyxine le cycle peptidique est formé par cyclisation du groupe carboxyle de la thréonine (L-Thr) en position 10 avec le groupe α -aminé du résidu Dab en position 4. Le groupe γ -aminé de ce résidu Dab est

lui-même attaché à la chaîne latérale du tripeptide (Storm *et al.*, 1977). Leurs poids moléculaires varient de 1129 à 1218 Da (Vogler & Studer, 1966 ; Parker & Rathnum, 1975 ; Orwa *et al.*, 2001 ; Govaerts *et al.*, 2002a & 2002b ; Martin *et al.*, 2003). Dans les polymyxines, les acides gras attachés à la chaîne latérale sont généralement des acides heptanoïque ou octanoïque ou leurs dérivés méthylés (Orwa *et al.*, 2001, Price *et al.*, 2007). L'acide nonanoïque a également été rapporté pour des polymyxines (Govaerts *et al.*, 2002b). La chaîne peptidique chargée et la queue d'acide gras hydrophobe donnent un caractère amphiphile aux polymyxines. Ce caractère amphiphile favorise leur solubilité à la fois dans les milieux aqueux et non aqueux (Hermsen *et al.*, 2003) et constitue une propriété essentielle pour leur activité antibactérienne (Velkov *et al.*, 2013).

.IV.2.3 Spectre d'activité

Les polymyxines sont principalement actives contre les pathogènes à Gram-négatif. La grande majorité des isolats d'*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Acinetobacter sp.*, sont sensibles aux polymyxines (Landman *et al.*, 2008). Des activités antimicrobiennes contre *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Haemophilus sp.*, *Bordetella pertussis* et *Legionella pneumophila* ont aussi été détectées (Li *et al.*, 2005 ; Landman *et al.*, 2008). Des espèces comme les *Proteus sp.*, les *Providencia sp.*, les *Serratia sp.*, les *Brucella sp.*, les *Neisseria sp.*, les *Chromobacterium sp.*, ainsi que les *Burkholderia sp.*, sont résistantes aux polymyxines (Falagas & Kasiakou, 2005 ; Landman *et al.*, 2008). Les polymyxines n'ont pas d'activité sur les coques aérobies à Gram-négatif et positif, les bacilles aérobies à Gram-positif, les bactéries anaérobies, les champignons et les parasites (Storm *et al.*, 1977 ; Hermsen *et al.*, 2003).

.IV.2.4 Mécanisme d'action

Les polymyxines exerceraient leur effet bactéricides via une interaction directe avec le lipide A du lipopolysaccharide (LPS) (Figure 22 p. 56). Le LPS est un composant structurel de la membrane externe constitué d'antigène O, de polysaccharide et de lipide A qui possède des groupes phosphate chargés négativement (Raetz & Whitfield, 2002) (Figure 22B). Il est chargé négativement et participe à l'intégrité et à la stabilité de la membrane externe bactérienne. Les polymyxines se lieraient fortement au LPS puis provoqueraient un changement de perméabilité de la membrane interne, ce qui entraînerait la mort cellulaire (Storm *et al.*, 1977).

Ainsi différents mécanismes d'actions ont été proposés sur la base d'études biophysique (Velkov *et al.*, 2010). Ces modèles se rejoignent sur le fait que les polymyxines agissent comme des tensioactifs et que le lipide A est une cible importante pour ce mécanisme (Velkov *et al.*, 2010). D'une part, les polymyxines ont 5 charges positives portées par les acides diaminobutyriques (à pH physiologique) et d'autre part le LPS contient des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Par conséquent, les polymyxines se lient aux LPS anioniques par interactions électrostatiques entre les résidus Dab chargés positivement et les groupes phosphate du lipide A chargés négativement puis déplacent le magnésium (Mg^{2+}) et le calcium (Ca^{2+}), qui normalement stabilisent le LPS dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Ces interactions électrostatiques initiales stabilisent le complexe transitoire LPS-polymyxine et permettent à l'acide gras non polaire (interaction hydrophobe) de la polymyxine de s'insérer en profondeur dans la membrane externe (Schindler & Osborn, 1979 ; Hancock, 1997 ; Hancock & Lehrer, 1998 ; Clausell *et al.*, 2007 ; Velkov *et al.*, 2010 & 2013) (Figure 22C).

Des études récentes sur la structure des complexes LPS-polymyxine (Figure 22A) par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par Titration Calorimétrique Isotherme (TCI) illustrent en détail les interactions électrostatiques et hydrophobes entre elles. Lors du contact initial de la polymyxine avec le LPS, l'insertion de l'acide gras et de la partie hydrophobe du polypeptide (acides aminés en position 6 et 7) déstabilise les chaînes d'acides gras du lipide A et conduit à la perte de l'intégrité de la membrane externe (Velkov *et al.*, 2010 & 2013). Après passage à travers la membrane externe, les polymyxines perturbent la barrière physique de la bicouche phospholipidique de la membrane interne, ce qui conduit à la formation de pores transitoires (Figure 23 p. 57). Il en résulte un déséquilibre osmotique et finalement la mort cellulaire (Hancock, 1997 ; Hancock & Chapple, 1999 ; Clausell *et al.*, 2007 ; Velkov *et al.*, 2010). D'autres molécules perturbatrices (antibiotiques ou produits toxiques) pourraient pénétrer dans les cellules à travers ces pores transitoires et accélérer le processus de mort cellulaire (Hancock, 1997).

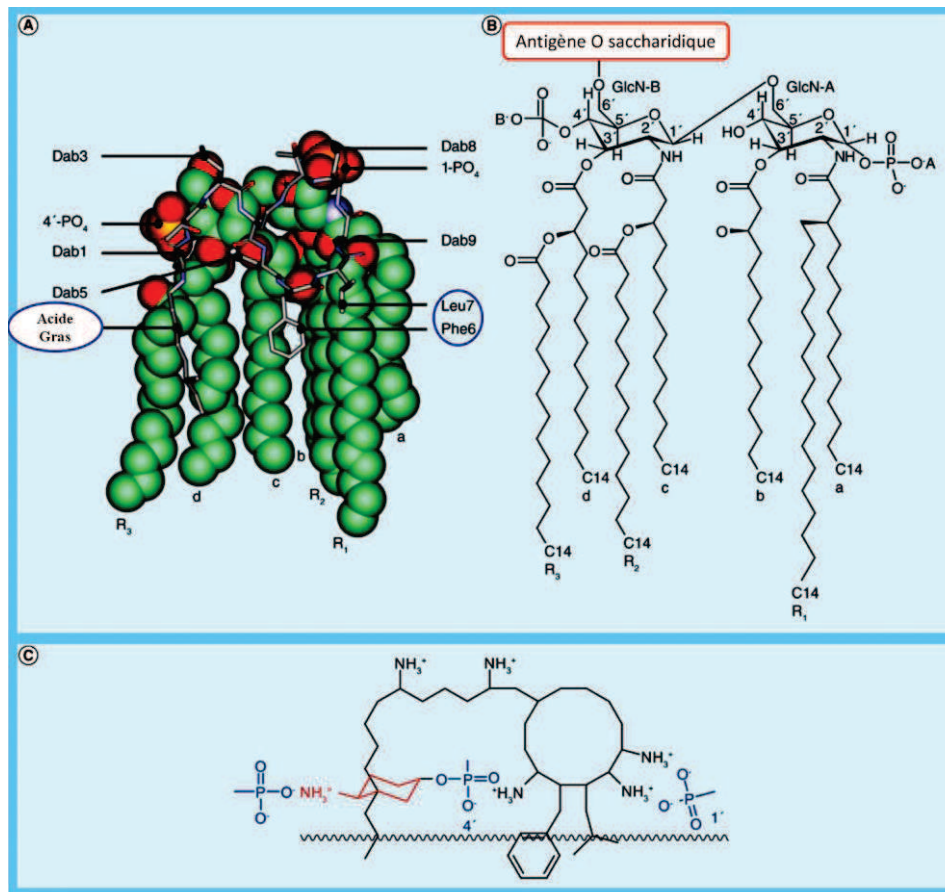


Figure 22 : Modèles moléculaires illustrant les interactions entre la polymyxine B₁ et la structure du lipide A de *Klebsiella pneumoniae* (Velkov *et al.*, 2013).

(A) Modèle moléculaire du complexe Lipide A représenté en vert et polymyxine B₁ représenté en bâtonnet. (B) Structure chimique du lipide A. (C) Interactions électrostatiques entre les résidus d'acides diaminobutyriques (Dab) des polymyxines chargés positivement et les phosphoesters du lipide A chargés négativement.

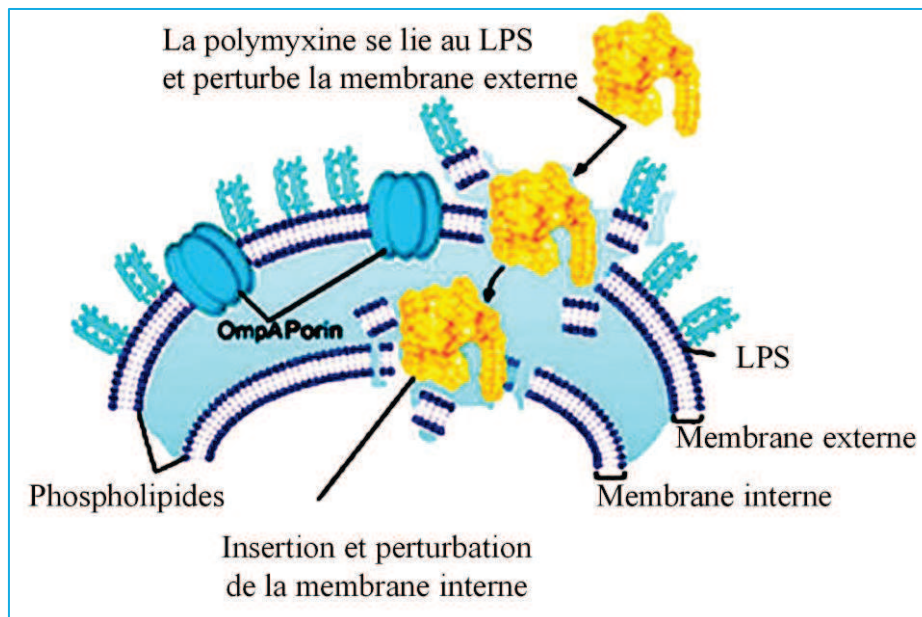


Figure 23 : Activité antimicrobienne de la polymyxine B sur la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Velkov *et al.*, 2010).

.IV.2.5 Mécanisme de résistance

Les bactéries à Gram-négatif peuvent développer une résistance aux polymyxines par mutation ou par adaptation. Les bactéries résistantes à un groupe de polymyxine présentent également une résistance aux autres groupes du fait de leur homologie structurale (Evans *et al.*, 1999). Le LPS étant le point d'ancrage des polymyxines, la plupart des mécanismes de résistance sont basés sur la modification du LPS, en particulier du lipide A de la membrane externe (Zavascki *et al.*, 2007).

La résistance chez *Pa*, *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium, *E. coli*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae* est due aux modifications des phosphates du lipide A par ajout de groupements chargés positivement, tels que le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (LAra4N) et/ou la phosphoéthanolamine (Helander *et al.*, 1994 & 1996 ; Moskowitz *et al.*, 2004 ; Perez & Groisman, 2007 ; Raetz *et al.*, 2007 ; Clements *et al.*, 2007 ; Adams *et al.*, 2009 ; Beceiro *et al.*, 2011 ; Fernandez *et al.*, 2012). La première étape de l'action des polymyxines sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif implique une interaction électrostatique entre les résidus d'acides diaminobutyriques chargés positivement et les groupes phosphate du lipide A chargés négativement (Clausell *et al.*, 2007). Par conséquent, en diminuant la charge négative nette de la membrane externe via les modifications du lipide A, la cellule bactérienne réduit cette

attraction électrostatique (Gunn *et al.*, 1998 & 2000 ; Macfarlane *et al.*, 1999 ; Breazeale *et al.*, 2005 ; kline *et al.*, 2008 ; Arroyo *et al.*, 2011).

Chez de nombreuses espèces bactériennes, la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques est médiée par des systèmes de régulation à deux composants, tels que PhoP-PhoQ (Gunn *et al.*, 1998 ; Macfarlane *et al.*, 1999) (Figure 24).

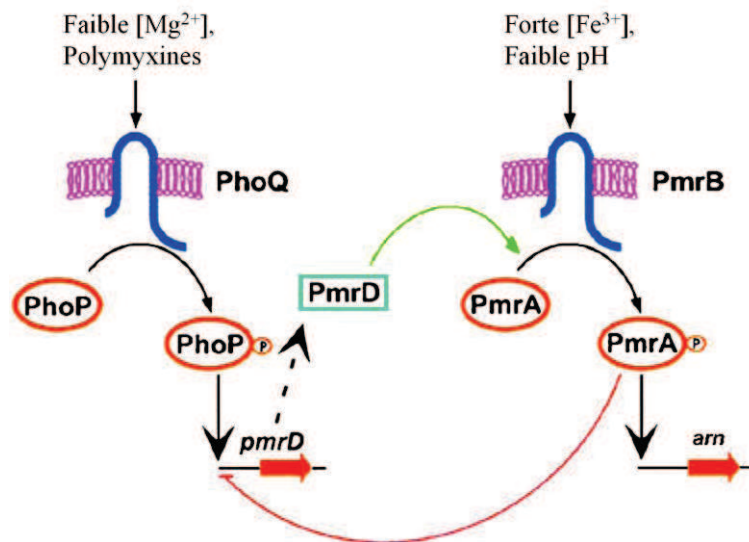


Figure 24 : Systèmes de régulation à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (adapté de Kato *et al.*, 2003 ; Falagas *et al.*, 2010).

La modification du LPS par incorporation de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (Lara4N) est médiée par les systèmes PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ. À faible concentration de Mg^{2+} ou en présence de polymyxines, le senseur membranaire PhoQ phosphoryle le régulateur PhoP qui va activer un autre système à deux composants PmrA-PmrB via la protéine PmrD. Par la suite, PmrA-PmrB active l'expression des gènes qui codent pour les enzymes capables de modifier les groupes phosphates du lipide A par ajout de Lara4N ou de phosphoethanolamine (opéron *arn*). PmrA peut exercer une rétroaction négative en réprimant la transcription de *pmrD* en présence de forte concentration de Fe^{3+} .

Ce système est également utilisé par la cellule bactérienne pour la survie dans des conditions présentant des faibles concentrations de Mg^{2+} ou de Ca^{2+} . Le système PhoP-PhoQ est largement étudié chez *S. enterica*, où il régule la virulence et la résistance aux polymyxines chez cette bactérie (Gunn *et al.*, 1998 & 2008). Ainsi à faible concentration de Mg^{2+} ou en présence de polymyxines, le senseur membranaire PhoQ phosphoryle le régulateur PhoP, conduisant à l'activation d'un autre système à deux composants PmrA-PmrB via la protéine PmrD. Par la suite, PmrA-PmrB active l'expression des gènes qui codent pour les enzymes capables de modifier les groupes phosphates du lipide A par ajout de Lara4N ou de phosphoethanolamine

(Gunn *et al.*, 1998 & 2008). Le système PmrA-PmrB est également activé par une forte concentration en Fe^{3+} ou un faible pH (Kato *et al.*, 2003 ; Perez & Groisman, 2007) (Figure 24). De telles modifications du lipide A ont été mises en évidence chez d'autres bactéries à Gram négatif telles que *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, et *Yersinia pestis* (Falagas *et al.*, 2010). Notons que chez *P. aeruginosa* les concentrations en Mg^{2+} peuvent activer directement le système PmrA-PmrB (McPhee *et al.*, 2003).

Un nouveau mécanisme de résistance aux polymyxines qui implique une perte complète de production du LPS a été signalé chez *A. baumannii* (Moffatt *et al.*, 2010 & 2011). Afin de compenser l'intégrité de la membrane externe qui est fragilisée par la perte du LPS, les souches d'*A. baumannii* résistantes aux polymyxines régulent positivement l'expression des gènes de biosynthèse de phospholipides, de lipoprotéines et de poly- β -1,6-N-acétylglucosamine pour consolider la structure de leur enveloppe cellulaire (Henry *et al.*, 2012).

Certains mécanismes de résistance aux polymyxines n'impliquent pas directement le LPS. Par exemple, une étude réalisée chez *K. pneumoniae* montre que la surproduction de polysaccharides capsulaires augmente la résistance à la polymyxine en limitant les interactions de cette dernière avec la surface de la bactérie (Campos *et al.*, 2004 ; Llobet *et al.*, 2008). Dans les biofilms de *Pa*, la résistance à la colistine coïncide avec une surexpression du système de pompe à efflux MexAB-OprM (Pamp *et al.*, 2008). La pompe à efflux AcrAB-TolC confère une résistance aux polymyxines chez *K. pneumoniae* et *E. coli* (Warner *et al.*, 2010).

Une étude récente a montré que le déficit en hopanoïde chez *Burkholderia multivorans* coïncide avec une sensibilité accrue aux polymyxines, suggérant ainsi que les hopanoïdes contribuent à la résistance intrinsèque de *Burkholderia* aux polymyxines (Malott *et al.*, 2012 & 2014). Les hopanoïdes sont des composés qui joueraient un rôle de barrière dans la membrane externe de certaines espèces bactériennes (Sahm *et al.*, 1993).

Une augmentation de la sensibilité aux polymyxines chez *Burkholderia cepacia* et *Proteus mirabilis* qui sont des espèces intrinsèquement résistantes a été associée à des défauts de l'UDP-glucose-déshydrogénase et de l'UDP-glucose phosphorylase qui sont des enzymes impliquées dans la biosynthèse du précurseur du LPS, l'UDP-glucose (Loutet *et al.*, 2009 ; Jiang *et al.*, 2010).

La Figure 25 montre les différents mécanismes utilisés dans la résistance aux polymyxines.

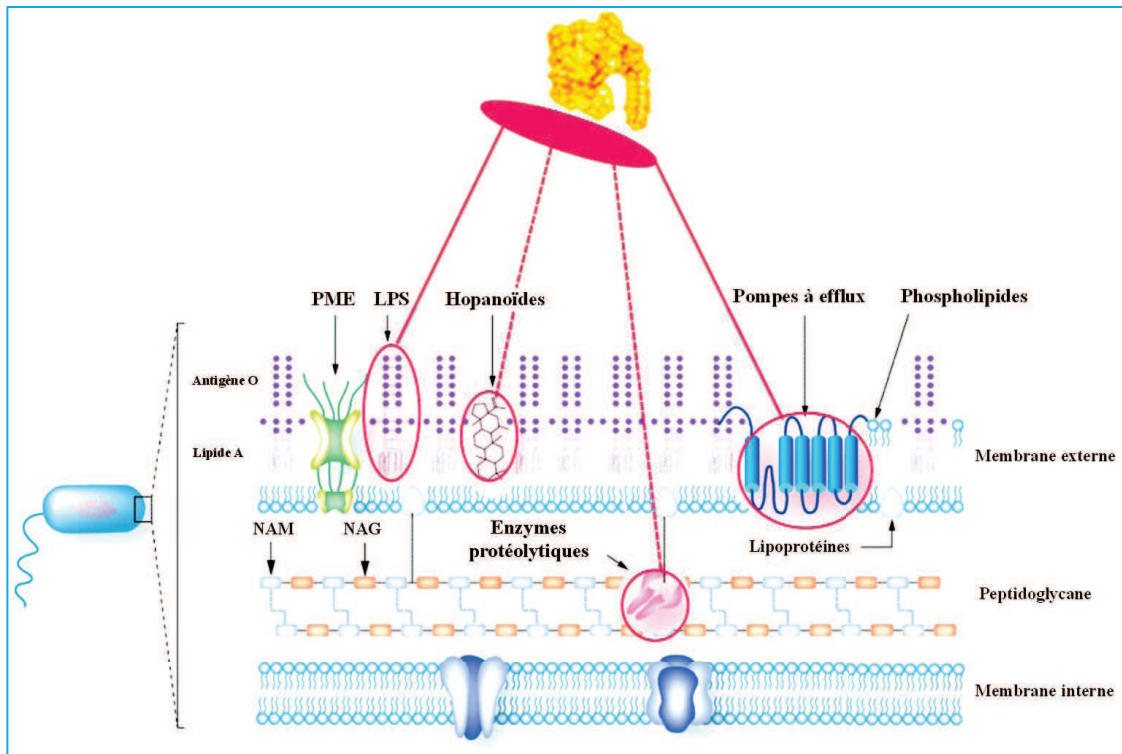


Figure 25 : Mécanismes de résistance aux polymyxines développés par les bactéries à Gram négatif (adapté de Velkov *et al.*, 2013).

La couleur rose indique les différentes stratégies moléculaires utilisées par les bactéries pour résister aux polymyxines (le lipopolysaccharide, les hopanoïdes, les pompes à efflux et les enzymes protéolytiques).

PME = protéine membranaire externe, LPS = lipopolysaccharide, NAM = acide N-acétylmuramique et NAG = N-acétylglucosamine.

.IV.2.6 Utilisation clinique des polymyxines

En pratique clinique, seule la colistine (polymyxine E) et la polymyxine B sont utilisées comme antibiotiques pour lutter contre les infections dues aux bactéries Gram-négatif multirésistantes. La colistine a été plus largement utilisée que la polymyxine B (Li *et al.*, 2006). La principale différence entre ces deux molécules se trouve au niveau de l'acide aminé en position 6 qui est une phénylalanine dans la polymyxine B et une leucine dans la colistine (Figure 21 p. 52). La colistine et la polymyxine B sont un mélange de plusieurs composés (au moins 30 composés pour la colistine), dont les deux composants majeurs sont respectivement la colistine A (polymyxine E₁) et la colistine B (polymyxine E₂) ; et la polymyxine B₁ et la polymyxine B₂ (Elverdam *et al.*, 1981 ; Evans *et al.*, 1999 ; Orwa *et al.*, 2000 & 2001 ; Govaerts *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2005).

En France la colistine est commercialisée sous deux formes galéniques : le sulfate de colistine et le colistiméthate sodique (CMS), aussi appelé méthane-sulfonate de colistine.

Le sulfate de colistine est administré par voie orale pour la décontamination digestive des patients immunodéprimés, et par voie cutanée pour le traitement des infections bactériennes cutanées dues à *Pa*. Le colistiméthate sodique est utilisé pour un usage parentéral (intraveineuse, intramusculaire) pour traiter les septicémies, les infections des plaies, des voies urinaires et des voies respiratoires causées par *Pa* (Carroll *et al.*, 1961 ; Evans *et al.*, 1999 ; Levin *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2005). Les deux formes galéniques sont administrables sous forme d'aérosol. Chez les patients atteints de mucoviscidose, la colistine sous forme d'aérosol est utilisée depuis ces 30 dernières années pour traiter la colonisation des voies respiratoires par *Pa* (Jensen *et al.*, 1987 ; Littlewood *et al.*, 1985 & 2000 ; Valerius *et al.*, 1991 ; Frederiksen *et al.*, 1997 ; Bauldoff *et al.*, 1997 ; Conway *et al.*, 2003 ; Hoiby *et al.*, 2005 ;).

Le colistiméthate sodique est moins puissant et moins toxique que le sulfate de colistine lorsqu'il est administré par voie parentérale (Beveridge & Martin 1967). Il est considéré comme étant une prodrogue de la colistine (Bergen *et al.*, 2006) et est produit en ajoutant à la colistine du formaldéhyde et du bisulfite de sodium (Barnett *et al.*, 1964). Le CMS est instable *in vitro* et *in vivo*, et est hydrolysé en une trentaine de dérivés méthane-sulfonés et en colistine, molécule qui est beaucoup plus stable dans le plasma humain (Li *et al.*, 2003a & 2003b ; Li *et al.*, 2004). Le sulfate de colistine est stable dans l'eau à 4°C pendant 60 jours et à 37°C durant 120 H, mais n'est pas stable dans un tampon phosphate et dans le plasma humain à 37°C (Li *et al.*, 2003a).

Contrairement à la colistine qui est administrée sous forme de prodrogue, la polymyxine B est administrée directement sous sa forme active (sulfate de polymyxine B) par voie parentérale (Hermsen *et al.*, 2003 ; Falagas & Kasiakou 2005 ; Landman *et al.*, 2008) et par inhalation. Elle est également utilisée en combinaison avec d'autres antibiotiques dans des préparations topiques, ophtalmiques et otiques. La littérature rapporte qu'au Japon, la polymyxine B a été intégrée dans des cartouches d'hémo perfusion utilisées pour retirer le lipopolysaccharide dans le sang afin de bloquer le processus initial de septicémie (Rachoin *et al.*, 2010).

À l'échelle internationale, la colistine par voie parentérale est beaucoup plus utilisée que la polymyxine B parentérale (Li *et al.*, 2006). Cette dernière n'est disponible que dans trois pays : États-Unis, Brésil et Singapour (Bergen *et al.*, 2012).

.IV.2.7 Toxicité des polymyxines

.IV.2.7.1 Études initiales

La colistine et la polymyxine B ont été rapidement associées à des néphrotoxicités et neurotoxicités importantes, ce qui a limité leur utilisation (Pedersen *et al.*, 1971). Elles ont été remplacées par d'autres antibiotiques mieux tolérés (aminoglycosides) à partir des années 1970 (Falagas & Kasiakou, 2005 ; Li *et al.*, 2005 & 2006 ; Landman *et al.*, 2008). Les deux types de toxicités sont dose-dépendantes et disparaissent généralement à l'arrêt du traitement (Evans *et al.*, 1999).

La toxicité neurologique est associée à des étourdissements, une fatigue, une paresthésie du visage et des périphériques, des vertiges, des troubles visuels, une confusion et un blocage neuromusculaire, pouvant conduire à une insuffisance respiratoire ou une apnée (Falagas *et al.*, 2006). La toxicité rénale se manifeste essentiellement par une néphropathie tubulaire aigüe, à l'origine d'une diminution de la clairance de la créatinine (Evans *et al.*, 1999).

.IV.2.7.2 Toxicité revisitée

Des études récentes ont démontré que la cytotoxicité (rein/système nerveux) mesurée dans les années 1970 pourrait avoir été surestimée (Markou *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2006 ; Falagas *et al.*, 2005 & 2006 ; Sarkar *et al.*, 2007). Cela pourrait annoncer un regain d'intérêt pour ces antibiotiques (Falagas *et al.*, 2006 & 2008 ; Yuan *et al.*, 2008 ; Velkov *et al.*, 2010). La littérature rapporte que la toxicité observée durant les premières études cliniques était probablement due au manque d'études pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques ; et à la diversité des étiquetages (Li *et al.*, 2005a). Dans différents pays, le colistiméthate sodique existe sous 2 formes commerciales, l'une avec titration et étiquetage en unités internationales (UI), l'autre en mg de colistine, ce qui pourrait poser des problèmes de dosage. De plus la présence d'autres médicaments et l'absence d'ajustement des posologies en présence d'une insuffisance rénale contribue également à l'augmentation de la toxicité (Li *et al.*, 2005b).

.IV.2.7.3 Synthèse chimique

La toxicité des polymyxines serait liée à leur caractère fortement cationique (Ouderkirk *et al.*, 2003). Ces dernières années, la synthèse chimique de dérivés de polymyxines a été réalisée. En 2010, Vaara *et al.*, ont réussi à synthétiser chimiquement des dérivés de polymyxines portant seulement 3 charges positives contre 5 pour les molécules commercialisées (Vaara *et al.*, 2008 et 2010abc) (Figure 26). Ces dérivés présentent une partie cyclique identique à celle de la polymyxine B avec des différences au niveau de la chaîne latérale. Les 3 charges positives de ces structures sont portées par les acides diaminobutyriques (L-Dab) présents dans ces molécules. L'affinité de ces molécules pour la bordure en brosse des cellules des tubules rénaux a été plus faible que celle mesurée avec la polymyxine B. Certaines de ces molécules ont même des clairances rénales, 8 à 400 fois supérieures à celles mesurées avec la colistine (Vaara *et al.*, 2010bc ; Vingsbo Lundberg *et al.*, 2010).

Par conséquent, ces structures de synthèses moins cationiques pourraient avoir moins d'effets secondaires que les polymyxines d'origine bactérienne commercialisées, avec des activités antimicrobiennes équivalentes (Vaara *et al.*, 2010bc & 2012).

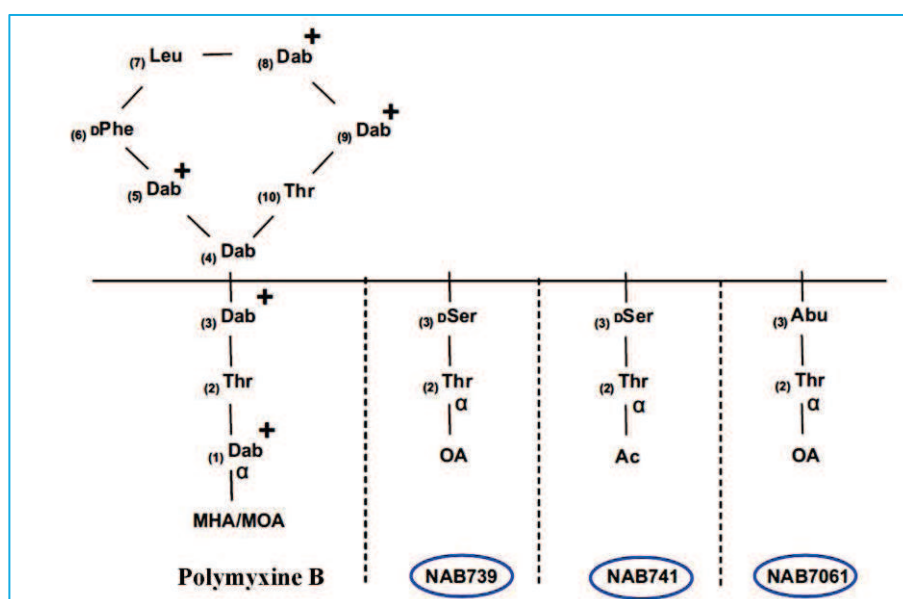


Figure 26 : Structures de la polymyxine B et des dérivés NAB739, NAB741 et NAB7061 synthétisés (Mingeot-Leclercq *et al.*, 2012).

Pour les acides aminés : Dab = acide diaminobutyrique, Leu = Leucine, Phe = Phénylalanine, Thr = Thréonine, Ser = Sérine, Abu = aminobutyryle. Pour les acides gras : MHA/MOA = acide-6-méthyl-heptanoïque/octanoïque, OA = acide octanoïque, Ac = acétyle. Les 5 charges positives des groupes aminés libres sont également représentées.

.IV.2.8 Production des polymyxines par l'industrie pharmaceutique

La colistine et la polymyxine B sont produites par l'industrie pharmaceutique en cultivant des souches de *P. polymyxa* en fermenteur. Les milieux de cultures utilisés sont riches, et contiennent notamment de l'amidon de pomme de terre, et/ou de l'extrait de levure (Eliasson Lantz *et al.*, 2006). Ces exigences nutritives rendent la conduite de la fermentation ainsi que la purification des antibiotiques difficiles à mener. Cependant ces bioproductions restent meilleur marché que la synthèse chimique.

.IV.3 Les fusaricidines

Les fusaricidines sont des lipopeptides antibiotiques également produits par des souches de *P. polymyxa*. Elles sont composées d'une partie acide gras (acide 15-guanidino-3-hydroxypentadécanoïque ou GHPD) lié à un hexapeptide cyclique comprenant quatre acides aminés de configuration D (Nakajima *et al.*, 1972 ; Kurusu *et al.*, 1987 ; Kajimura & Kaneda, 1996 et 1997 ; Kuroda *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2007 ; Choi *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2013). Les fusaricidines diffèrent des polymyxines par la présence de liaisons esters entre certains acides aminés (depsipeptides) de la partie cyclique (liaisons peptidiques pour les polymyxines). À ce jour, quatre formes de fusaricidines notées A, B, C et D ont été décrites (Figure 27).

```

graph LR
    GHPD[GHPD] --> L-Thr[L-Thr]
    L-Thr --> Pos2[Pos 2]
    Pos2 --> Pos3[Pos 3]
    Pos3 --> D-allo-Thr[D-allo-Thr]
    D-allo-Thr --> Pos5[Pos 5]
    Pos5 --> D-Ala[D-Ala]
    D-Ala --> L-Thr
  
```

Fusaricidines	Pos 2	Pos 3	Pos 5	Masse (Da)	Formule brute
A	D-Val	L-Val	D-Asn	883	C ₄₁ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₁
B	D-Val	L-Val	D-Gln	897	C ₄₂ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₁
C	D-Val	L-Tyr	D-Asn	947	C ₄₅ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
D	D-Val	L-Tyr	D-Gln	961	C ₄₆ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂

Figure 27 : Structure chimique des fusaricidines A, B, C et D produites par *P. polymyxa*.

GHPD = 15-guanidino-3-hydroxypentadécanoïque. Pos 2, Pos3 et Pos 5 = positions variables des acides aminés dans les fusaricidines d'après (Li *et al.*, 2007 ; Choi *et al.*, 2007 et Deng *et al.*, 2011).

Les fusaricidines ont une excellente activité antifongique contre les champignons pathogènes des plantes tels que *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, et *Penicillium thomii*. La fusaricidine B présente une activité antagoniste contre *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Choi *et al.*, 2007). Les Fusaricidines ont aussi une excellente activité contre les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* (Kajimura & Kaneda, 1996 & 1997). En outre, elles ont une activité antifongique contre *Leptosphaeria maculans* qui provoque la maladie de la jambe noire du canola au Canada (Kharbanda *et al.*, 1997 ; Beatty & Jensen, 2002). Les fusaricidines affectent plus faiblement la croissance des bactéries à Gram négatif.

Les mécanismes d'actions de ces molécules encore peu étudiées, ne sont pas connus pour le moment. Chez *P. polymyxa* PKB1 les fusaricidines sont produites au début de la phase de sporulation (Beatty & Jensen, 2002). De nombreux ions métalliques comme les Zn²⁺, Fe³⁺ et Mg²⁺ affecteraient la production de fusaricidine chez *P. polymyxa* SQR-21 (Raza *et al.*, 2010ab). Contrairement à la polymyxine B et à la colistine, les fusaricidines ne sont pas commercialisées en tant qu'antibiotiques.

V CLUSTERS DE GÈNES DE PRODUCTION DES POLYMYXINES ET DES FUSARISCIDINES

Bien que les structures chimiques de nombreuses polymyxines et fusaricidines soient connues depuis plusieurs années, les études moléculaires sur les mécanismes de biosynthèse de ces molécules sont récentes. Récemment, Shaheen & Jensen (2011, Canada), Li & Jensen (2007, Canada) et Park & Choi (2007, 2009) ont identifiés les clusters de gènes responsables de la production des polymyxines et des fusaricidines chez des souches de *P. polymyxa*. Leurs travaux ont révélés que ces molécules étaient produites par des NRPS (Figure 28).

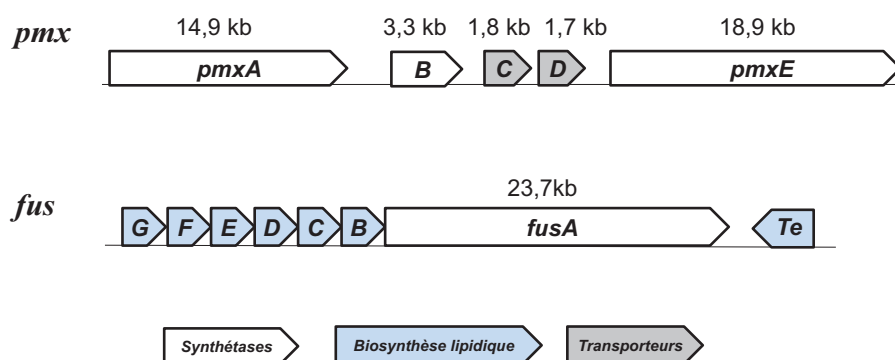


Figure 28 : Clusters NRPS de production de la polymyxine A (*pmx*) et des fusaricidines (*fus*) chez *P. polymyxa* d'après (Li *et al.*, 2007 ; Choi *et al.*, 2009 ; Shaheen *et al.*, 2011).

.V.1 Cluster de biosynthèse des polymyxines (*pmx*)

En 2009, Choi *et al* ont identifié le cluster de gènes impliqués dans la production de la polymyxine A chez le *P. polymyxa* E681 (Figure 21 p. 52). Par la suite, un brevet US 8,329,430 a été déposé par Park *et al* (2012) pour ce cluster ainsi que pour deux autres impliqués dans la production des polymyxines B et E identifiés respectivement chez les *P. polymyxa* F4 et ATCC21830. Ces clusters *pmx* couvrent tous une région d'environ 40 kb et se composent de cinq gènes nommés : *pmxA*, *pmxB*, *pmxC*, *pmxD* et *pmxE*. Les gènes *pmxC* et *pmxD* codent pour des protéines de transport, alors que les trois autres gènes *pmxA*, *pmxB* et *pmxE* codent pour des synthétases de respectivement 4, 1 et 5 modules (Figure 28).

Chez le *Paenibacillus polymyxa* E681, la production de polymyxine A a été démontrée grâce à la construction et la caractérisation d'une souche mutante *pmxE*, avec une mutation dans le

gène correspondant. La technique de mutagenèse par « PCR-Targeting » a été utilisée pour déléter le gène *pmxE* et le remplacer par une cassette de résistance à un antibiotique. Cette mutagenèse a entraîné une perte totale de la production de polymyxine A. Le cluster de gènes *pmx* de *P. polymyxa* E681 a ensuite été introduit dans la souche *Bacillus subtilis* 168. Une production hétérologue faible de la polymyxine A a été rendue possible après ajout de l'acide L-2,4-diaminobutyrique (Dab) dans le milieu de culture. Sans ce précurseur, la synthèse de la polymyxine par le *B. subtilis* recombinant était impossible (Choi *et al.*, 2009). Ceci suggère que le *Bacillus* n'est pas équipé pour produire le Dab.

Par ailleurs d'autres travaux de cette équipe ont révélés que deux facteurs de transcriptions Spo0A et AbrB étaient impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la polymyxine (Park *et al.*, 2012). La suppression du gène *Spo0A* qui initie la sporulation entraîne une perte totale de production de polymyxine chez le *B. subtilis* recombinant. La production de polymyxine dépend donc de la sporulation. Leurs travaux ont révélés que la protéine AbrB localisé en amont de *pmxA* fonctionnerait comme un régulateur négatif de la transcription (Park *et al.*, 2012).

En 2011, Shaheen *et al* ont également décrit l'identification et le séquençage d'un cluster de gènes de production de la polymyxine B chez *P. polymyxa* PKB1. Ce cluster présente une disposition comparable au cluster de gènes de biosynthèse de la polymyxine A proposé par (Choi *et al.*, 2009). D'après les prédictions *in silico*, ce cluster *pmx* serait impliqué dans la biosynthèse de variants de la polymyxine B, comprenant en position 3 non pas un résidu L-2,4-diaminobutyrique mais son énantiomère, le D-2,4-diaminobutyrique. L'implication de ces gènes dans la biosynthèse de la polymyxine B a été démontré par mutagenèse par « PCR-Targeting » dans le gène *pmxE* et dans les transporteurs *pmxC* et *pmxD*. Fait intéressant, la souche mutante $\Delta pmxE$ ne produit plus de polymyxine B, et les mutations $\Delta pmxC$ et $\Delta pmxD$ ont entraîné une diminution de la production de polymyxine B par rapport à la souche sauvage PKB1.

Récemment Niu *et al* (2013) ont décrits un autre cluster de gènes de production de la polymyxine P, chez la souche *P. polymyxa* M-1 après séquençage de son génome. Cependant la fonction et la spécificité de ce cluster restent à être démontrées puisque pour l'heure ce travail n'a été effectué qu'*in silico*.

.V.2 Cluster de biosynthèse des fusaricidines (*fus*)

Le cluster de production de la fusaricidine (32,4 kb) est composé de 8 gènes notés *fusA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* et *Te* (Figure 28). Ce cluster a été isolé respectivement chez les *P. polymyxa* E681 (Choi *et al.*, 2007), *P. polymyxa* PKB1 (Li *et al.*, 2007), *P. polymyxa* DBB1709 (Han *et al.*, 2012) et *P. polymyxa* SQR-21 (Li *et al.*, 2013). Le gène *fusA* code pour la production d'une synthétase de 6 modules, tandis que les gènes *fusB*, *C*, *D*, *E*, *F* et *G* seraient impliqués dans la biosynthèse de la fraction lipidique. Le gène *fusTe*, pourrait coder pour une thioestérase susceptible d'hydrolyser des groupements acyles ou amino-acyles fixés sur le cofacteur 4'-phosphopantétheine. Cette activité permettrait d'éliminer des groupements inadaptés fixés sur la synthétase. Selon une autre hypothèse, *fusTe* pourrait coder pour une acyltransférase catalysant le transfert de l'acide gras sur la partie peptidique de la fusaricidine (Li *et al.*, 2007).

Matériel et Méthodes

I TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

.I.1 Matériel biologique

.I.1.1 Souches bactériennes et plasmides

Toutes les souches et les plasmides utilisés dans cette étude sont répertoriés dans les **Tableau 4** et **5**.

Tableau 4 : Souches microbiennes et conditions de cultures utilisées dans ce travail.

	<i>Milieux de culture</i>	<i>Température de croissance</i>	<i>Origine</i>
Bactérie Gram-négatif cibles des effets antibiotiques			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> hôpital BM0207	BN	37°C	CHU, Nantes
<i>Pseudomonas stutzeri</i> BM0043	BN	30°C	Coll. Lab
Bactéries Gram-positif cibles des effets antibiotiques			
<i>Bacillus cereus</i> BP001	BN	30°C	Coll. Lab
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP 103214	BN	30°C	Coll. Lab
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53154	BN	37°C	Coll. Lab
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25823	BN	37°C	Coll. Lab
<i>Micrococcus luteus</i> CIP 5345	BN	30°C	IUT La Rochelle
Bactéries compétentes pour transformation			
<i>Escherichia coli</i> JM109	M9 et LB	37°C	Promega
<i>Escherichia coli</i> EPI100-T1R	LB	37°C	Epicentre
<i>Escherichia coli</i> LE392MP	LB	37°C	Epicentre
<i>Escherichia coli</i> Réplicator Fos	LB	37°C	Lucigen
<i>Escherichia coli</i> VCS257	LB	37°C	Stratagene
Souches pour antibiogramme			
<i>Escherichia coli</i> CIP 7624	BN	37°C	IUT La Rochelle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 76110	BN	37°C	IUT La Rochelle
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	BN	37°C	Coll. Lab
<i>Providencia stuartii</i> CIP 107808	BN		Pasteur
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CIP 104485	BN		Pasteur
Souches anti-<i>P. aeruginosa</i>			
<i>Paenibacillus alvei</i> CIP 6618 ^T (PAL)	BN/LB	30°C	INRA, Avignon
<i>Paenibacillus polymyxa</i> LMG 13294 ^T DSM 36 ^T (PP)	LB	30°C	DEVM, Marseille
<i>Paenibacillus polymyxa</i> INRA 220 (PPI)	LB	30°C	INRA, Avignon
<i>Paenibacillus polymyxa</i> PKB1	BN/LB	30°C	Susan Jensen ¹
Souches étudiées			
<i>Paenibacillus</i> B-LR	BN/LB	30°C et 37°C	M2 Recherche ²
<i>Paenibacillus alvei</i> 32	BN/LB	30°C	Romain Chevrot ³

Coll. Lab : collection du laboratoire ; ¹ Department of Biological Sciences, CW-405 Biological Sciences Building, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2E9, Canada ; ² Master Recherche Fatoumata Tambadou, 2010 et ³ Thèse de Romain Chevrot, 2007.

BN : Bouillon Nutritif, LB : Luria Bertani et M9 : Milieu minimum (voir paragraphe .I.2.1 p. 74).

La souche *E. coli* JM109 est utilisée pour les étapes de clonage avec les plasmides pGEM-T et pGEM-7Zf(+) (Promega). Son génotype est (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rk^- , mK^+), *relA1*, *supE44*, λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, [F' , *traD36*, *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15]).

La souche *E. coli* EPI100-T1R est utilisée comme hôte des particules de phage λ lors de la réalisation de la banque fosmidique du *Paenibacillus* B-LR. Son génotype est [F^- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlacZ$ Δ M15 $\Delta lacX74$ *recA1* *endA1* *araD139* $\Delta(ara, leu)$ 7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG* *tonA*].

La souche *E. coli* Replicator FOS est utilisée comme hôte des particules de phage λ lors de la réalisation de la banque fosmidique du *Paenibacillus alvei* 32. Son génotype est [F^- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ *endA1* *recA1* $\phi 80dlacZ$ Δ M15 $\Delta lacX74$ *araD139* $\Delta(ara, leu)$ 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *nupG* (*attL* *araC*- P_{BAD} -*trfA*250 *bla* *attR*) λ^-].

Les souches *E. coli* LE392MP et *E. coli* VCS257 sont utilisées pour vérifier l'efficacité des extraits de phages MaxPlax λ et Gigapack III XL. Elles sont sensibles aux phages λ . Leurs génotypes respectifs sont [F^- $\epsilon 14-(McrA^-)$ $\Delta(mcrC-mrr)$ (*TetR*) *hsdR514* *supE44* *supF58* *lacY1* or $\Delta(lacIZY)$ 6 *galK2* *galT22* *metB1* *trpR55* λ^-] et [*supE44* *supF58* *hsdS3*(r_B^- m_B^-) *dapD8* *lacY1* *glnV44* $\Delta(gal-uvrB)$ 47 *tyrT58* *gyrA29* *tonA53* $\Delta(thyA57)$].

Tableau 5 : Liste des plasmides utilisés.

Plasmides	Caractéristiques	Référence
pGEM-T	Vecteur de clonage des produits de PCR, Amp ^R	Promega
pGEM-7Zf(+)	Vecteur de clonage non répliatif chez <i>Paenibacillus</i> , Amp ^R	Promega
pEpiFOS TM -5	Fosmide pour construction de banque d'ADN de la souche B-LR, Chl ^R	Epigene
pSMART-FOS	Fosmide pour construction de banque d'ADN de la souche 32, Chl ^R	Lucigen
pOJ260	Plasmide conjugatif non répliatif chez <i>Streptomyces</i> , Apra ^R	Bierman <i>et al.</i> ,
pET-28a	Vecteur de clonage des produits de PCR, Kan ^R	Novagen
pGEMT-C	Gène <i>pmxC</i> cloné dans pGEM-T, Amp ^R	Cette étude
pGEMT-D	Gène <i>pmxD</i> cloné dans pGEM-T, Amp ^R	Cette étude
pGEMT-B	Fragment PCR du gène <i>pmxB</i> (550 pb) cloné dans pGEM-T, Amp ^R	Cette étude
pGEMT-B1F1	Fin du gène <i>pmxE</i> (1430 pb) cloné dans pGEM-T, Amp ^R	Cette étude
pGEMT-Dab	Fragment PCR (395 pb) des domaines d'adénylations de l'acide aminé L-2,4-diaminobutyric cloné dans pGEM-T, Amp ^R	Cette étude
pGEMT-Pro	Fragment PCR (280 pb) des domaines d'adénylations de la proline cloné dans pGEM-T, Amp ^R	Cette étude
pGEM-7ZΔE	Fragment PCR du gène <i>pmxE</i> (1650 pb) cloné dans pGEM-7Zf(+), Amp ^R	Cette étude
pGEM-7ZΔE-Apra ^R	Cassette apramycine (1168 pb) de pOJ260 cloné dans pGEM-7ZΔE, Apra ^R , Amp ^R	Cette étude
pOJ260ΔAshunt	Fragment PCR du gène <i>pmxA</i> (1000 pb) cloné dans pOJ260, Apra ^R	Cette étude
EpiFOS-35 ¹	Clone fosmidique contenant une partie du cluster de gène de la colistine, Chl ^R	Cette étude
EpiFOS-42 ²	Clone fosmidique contenant une partie du cluster de gène de la colistine, Chl ^R	Cette étude
EpiFOS-57 ⁴	Clone fosmidique contenant une partie du cluster de gène de la colistine, Chl ^R	Cette étude

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline, Apra^R : gène de résistance à l'apramycine, Chl^R : gène de résistance au chloramphénicol, Kan^R : gène de résistance à la kanamycine. Le pOJ260 a été fourni par M^R Jean Luc Pernodet et M^{mc} Sylvie Lautru (IGM, France). Le pET-28a a été fourni par M^R Mohamed Marahiel (Marburg).

.I.2 Milieux et conditions de culture

.I.2.1 Milieux de culture

Milieu Luria Bertani (LB)

LB (Fisher Scientific)	15,5 g
Agar (Euromedex)	12 g
Agar pour LB Top agar	7 g
Eau distillée	qsp 1 L

Milieu Yeast Tryptone (YT)

Tryptone (Biokar Diagnostics ou BD)	8 g
Extrait de levure (BD)	5 g
NaCl (Carlo Erba)	5 g
Agar pour milieu solide	15 g
Eau distillée	qsp 1 L

Milieu Terrific Broth (TB)

Tryptone (BD)	11,8 g
Extrait de levure (BD)	23,6 g
KH ₂ PO ₄ anhydre (Merck)	2,2 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O (Merck)	9,4 g
Glycérol (VWR)	0,4%
Eau distillée	qsp 1 L

Milieu M9

Na ₂ HPO ₄ , 7H ₂ O (Merck)	12,8 g
KH ₂ PO ₄ anhydre	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl (Grosseron)	1 g
Agar pour milieu solide	12 g
Eau distillée	qsp 1 L
Avant utilisation, compléter avec une concentration finale de :	
MgSO ₄ , 7H ₂ O (Merck)	2 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O (Prolabo)	100 µM
Glucose (Merck)	0,4%
Thiamine (Sigma)	0,01%

Bouillon nutritif (BN)

BN (BD)	20 g
Agar pour milieu solide	12 g
Agar pour gélose molle	6 g
Eau distillée	qsp 1 L

Milieu caséine soja (TSA)

Bouillon caséine soja (BD)	30 g
Agar pour milieu solide	12 g
Eau distillée	qsp 1 L

Milieu cœur cervelle (BHI)

Bouillon cœur cervelle (BD)	37 g
Eau distillée	qsp 1 L

Milieu SOC (Hanahan, 1983)

Tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl (Labogros)	0,5 g
KCl (Carlo Erba)	0,2 g
Eau distillée	qsp 1 L
Avant utilisation, compléter avec une concentration finale de :	

Glucose (Merck)	20 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	10 mM
MgCl ₂ , 6H ₂ O (Merck)	10mM

Milieu M63 (Miller 1972)

KH ₂ PO ₄ anhydre	4,5 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	11,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	2 g
Eau distillée	qsp 1 L
Avant utilisation, compléter avec une concentration finale de :	
Glucose	0,2%
Thiamine	0,0001%
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,02%

Les différents milieux sont amenés à pH 7 puis autoclavés à 121°C pendant 15 min. Les antibiotiques et les suppléments nutritionnels sont stérilisés par filtration (0,22 µm) et ajoutés après refroidissement des milieux à 50°C.

.I.2.2 Milieux de productions d'antibiotiques

Les milieux synthétiques M63T et MODT50 sont utilisés pour la production des composés antibiotiques des souches B-LR et 32.

- **Milieu M63T** (Chevrot *et al.*, 2007)

Dans le cas du M63T, l'apport en azote et en carbone est triplé par rapport au milieu M63, soit pour 1 litre de milieu :

KH ₂ PO ₄ anhydre (Merck)	4,5 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O (Merck)	11,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	6 g
Eau distillée	qsp 1 L

Cette préparation est autoclavée 15 min à 121°C. Avant utilisation, il est ajouté :

Glucose 20%	30 mL
Thiamine 0,1%	1 mL
MgSO ₄ , 7H ₂ O 20%	1 mL

- **Milieu MODT50** (Chevrot *et al.*, 2007 & 2013)

Ce milieu est obtenu en ajoutant à la base minérale du milieu M63T, une solution d'oligo-éléments, d'acides aminés et de sucres.

Base minérale pour 1 litre milieu MODT50 :

KH ₂ PO ₄ anhydre (Merck)	4,5 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O (Merck)	11,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	6 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	40 mg

Acides aminés pour 1 litre de milieu MODT50 :

L-arginine	0,05 g	L-phénylalanine	0,05 g
Acide L-aspartique	0,05 g	L-thréonine	0,05 g
L-cystéine	0,04 g	L-valine	0,05 g
Acide L-glutamique	0,05 g	L-glycine	0,05 g
L-histidine	0,05 g	L-lysine	0,05 g
L-isoleucine	0,05 g	L-sérine	0,05 g
L-leucine	0,05 g	L-tyrosine	0,042 g
L-méthionine	0,05 g		

La base minérale et les acides aminés sont mélangés dans un volume final de 1 litre d'eau. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant autoclavage à 110°C pendant 10 min.

Solution 100X d'oligo-éléments pour 1 litre de milieu MODT50 :

CaCl ₂	27,5 mg	ZnCl ₂	8,5 mg
FeCl ₂ 6H ₂ O	67,5 mg	CuSO ₄	4 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	5 mg	CoCl ₂ 6H ₂ O	3 mg

Cette solution est stérilisée par filtration sur 0,22 µm et conservée à 4°C. Elle est ajoutée après autoclavage du milieu MODT50.

Sucre ajouté après autoclavage pour 1 litre de milieu MODT50 :

Glucose 20%	30 mL
-------------	-------

La solution de glucose est stérilisée par filtration sur 0,22 µm et conservée à 4°C. Elle est ajoutée après autoclavage du milieu MODT50.

.I.2.3 Conditions de culture

Toutes les souches d'*E. coli* utilisées sont cultivées en milieu riche LB à 37°C à l'exception de la souche *E. coli* JM109 qui est cultivée sur milieu minimum M9 gélosé pour assurer le maintien du facteur F'. Les cultures sont réalisées en étuve (Prolabo) sous conditions aérobies. Les cultures liquides sont réalisées sous agitation constante à 200 rpm (Agitateur GrantBio, POS-300).

Les souches de *Paenibacillus* sont cultivées en milieu riche BN à 30°C. Pour les expériences de transformation du *Paenibacillus* B-LR, le milieu riche BHI supplémenté en sucrose (10% final)

est utilisé. Le milieu LB est utilisé pour les extractions d'ADN de *Paenibacillus*. Pour la production des composés antibiotiques, le *Paenibacillus* B-LR est cultivé en milieu liquide M63T et le *Paenibacillus alvei* 32 en milieu liquide MODT50 (paragraphe .I.2.2 p. 75). Les volumes de culture occupent 1/5^{ème} de la capacité des Erlenmeyers. Toutes les cultures sont réalisées en étuve sous condition aérobie. Les cultures liquides sont réalisées sous agitation constante à 200 rpm.

.I.3 Conservation des souches

Toutes les souches utilisées lors de cette étude sont conservées à 4°C sur milieux solides pour une utilisation rapide. Pour une conservation à long terme, les souches sont conservées à -80°C. Les échantillons sont conservés dans des cryotubes en introduisant un volume équivalent de glycérol 30% stérile et d'une culture en phase exponentielle de croissance.

.I.4 Tests d'activités antimicrobiennes sur boîtes

.I.4.1 Préparation des surnageants

Les surnageants de culture de la bactérie B-LR et des mutants sont testés pour leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis de plusieurs souches cibles (Tableau 4, p. 71). Les précultures sont réalisées dans du BN pour la bactérie B-LR ou du BN contenant de l'apramycine (30 µg/mL) pour les mutants (200 rpm-30°C, une nuit). Les précultures sont alors centrifugées 10 min à 3000 g. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension et lavées deux fois dans du milieu de culture M63T. Les cultures se font en M63T et sontensemencées à une DO_{600nm} de 0,1 avec la préculture puis incubées sous agitation (200 rpm-30°C, 48 h). Les surnageants sont récoltés par centrifugation 20 min à 11000 g, à 4°C. Les surnageants sont ensuite chauffés 10 min à 100°C au bain marie. Ce traitement par la chaleur n'affecte pas l'activité inhibitrice étudiée. Après refroidissement les surnageants sont testés pour leur activité antimicrobienne.

Contrairement à la souche B-LR, la souche 32 est testée en piqure (paragraphe .I.4.3 p. 78).

.I.4.2 Tests simple couche

Des cultures de chacune des souches cibles (Tableau 4, p. 71) sont réalisées dans 5 mL de BN à 30 ou 37°C une nuit sous agitation à 160 rpm. Lorsque les souches cibles testées sont

P. aeruginosa BM0207 ou *P. stutzeri* BM0043, l'inoculum est dilué au $1/10^{\text{ème}}$. Des boîtes de 15 mL de gélose nutritive molle (agar 0,6%) sont directementensemencées dans la masse avec 10 μL de culture (souches cibles) (Figure 29). Des puits en verre stériles (4 mm x 8 mm, Polylabo) sont déposés sur les gélases après leur prise en masse. 10 à 100 μL de surnageant sont ajoutés dans les puits. En parallèle, des puits témoins sont réalisés avec du milieu de culture non cultivé amené au même pH que le surnageant testé. Les boîtes avec les puits sont incubées une nuit à 30°C ou 37°C suivant les exigences de la souche cible. Pour chaque surnageant testé, les tests se font en triplicatas. Après incubation, les halos d'inhibitions de croissance obtenus sont mesurés.

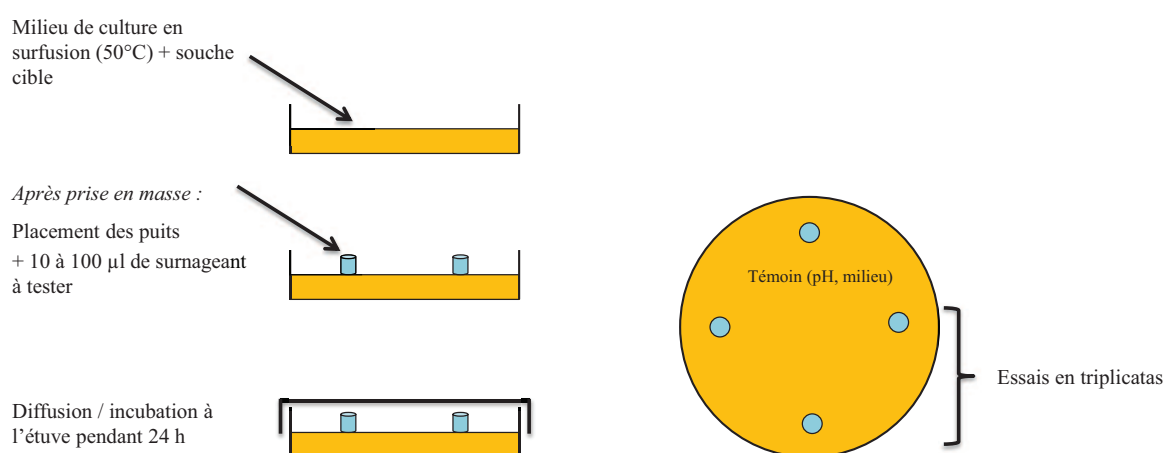


Figure 29 : Schéma général des tests d'activités en boîte simple couche.

.I.4.3 Tests en piqure

Pour ce test, les souches d'intérêts B-LR et 32 sont testées en piqures contre les souches cibles. Les conditions de culture des souches cibles sont décrites dans le paragraphe .I.4. Les colonies d'intérêts sont prélevées à l'aide de cônes stériles et piquées dans la gélose molle contenant la souche cible. Les piqures sont réalisées en duplicatas. Après une nuit d'incubation les halos d'inhibitions de croissance obtenus sont mesurés.

II TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

.II.1 Extraction d'ADN

.II.1.1 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à l'aide du kit « NucleoSpin Tissue » (Macherey-Nagel) avec quelques modifications. Les bactéries sont cultivées dans 4 mL de milieu LB (200 rpm-30°C, une nuit), puis centrifugées 5 min à 13500 g. Le culot est repris dans 200 µL de tampon (Tris-HCl 20 mM pH7,5, EDTA 2mM pH8 et Triton X-100 1%). Du lysozyme (Euromedex) et de la RNase A (Euromedex) sont ajoutés à une concentration finale de 20 mg/mL. Le mélange est incubé à 37°C pendant 60 min, puis 25 µL de protéinase K (Macherey-Nagel) sont ajoutées. Après 60 min d'incubation à 56°C sous agitation, 200 µL de tampon de lyse B3 sont ajoutés et le mélange est placé à 70°C pendant 10 min. Le lysat est centrifugé 5 min à 12000 g. La suspension est reprise dans 210 µL d'éthanol absolu puis transférée sur une colonne contenant une membrane de silice qui retient sélectivement l'ADN. La colonne est centrifugée 1 min à 12000 g et lavée successivement avec 500 µL de tampon BW et 600 µL de tampon B5 pour éliminer les sels et les protéines. La colonne est ensuite séchée par centrifugation pour éliminer les traces d'éthanol avant d'éluer l'ADN avec 50 µL de tampon (Tris-HCl 5 mM, pH8,5).

.II.1.2 Extraction d'ADN plasmidique (MiniPrep)

L'ADN plasmidique est extrait par lyse alcaline avec le kit « GeneJET Plasmid Miniprep » (Thermo Scientific). Les bactéries sont cultivées dans 5 mL de LB (230 rpm-37°C, une nuit) supplémenté avec l'antibiotique adéquat (ampicilline à 100 µg/mL, chloramphénicol à 12,5 µg/mL ou apramycine à 30 µg/mL). Après centrifugation le culot est repris dans 250 µL de solution de resuspension, puis 250 µL de solution de lyse sont ajoutées. Le mélange est homogénéisé délicatement par inversion du tube. Le mélange est neutralisé par 350 µL de solution de neutralisation et centrifugé 5 min à 12000 g pour éliminer l'ADN génomique et les débris cellulaires. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur une colonne puis centrifugé 1 min à 12000 g. La colonne est lavée deux fois avec 500 µL de tampon de lavage contenant de l'éthanol. La colonne est ensuite séchée par centrifugation à vide avant d'éluer l'ADN avec 50 µL de tampon (Tris-HCl 10 mM, pH8,5).

.II.1.3 Extraction d'ADN fosmidique (MaxiPrep)

L'ADN fosmidique des clones positifs est extrait avec le kit « NucleoBond Xtra Maxi Plus » (Macherey-Nagel) avec quelques modifications. C'est une maxi-préparation qui permet d'obtenir de grandes quantités d'ADN plasmidique à faible nombre de copies. Elle est basée sur le principe de la lyse alcaline suivie d'une étape de purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. Une préculture d'*E. coli* est réalisée dans 5 mL de LB (contenant 12,5 µg/mL de chloramphénicol) à 37°C sous agitation à 300 rpm pendant 8 h. Une culture est réalisée en inoculant 600 mL de LB (300 rpm-37°C, une nuit) contenant 12,5 µg/mL de chloramphénicol avec la préculture (0,1% final). Les cellules sont récupérées par centrifugation 10 min à 6000 g à 4°C. Le culot est repris successivement dans 30 mL de tampon RES puis dans 30 mL de tampon LYS, puis incubé 5 min à température ambiante. Le mélange est neutralisé avec 30 mL de tampon NEU pour précipiter les protéines et l'ADN chromosomique puis centrifugé 20 min à 6000 g. Le lysat clarifié est chargé sur le filtre NucleoBond® Xtra avec la colonne préalablement équilibrée puis lavé avec 20 mL de tampon EQU. Le filtre est éliminé et la colonne est lavée avec 25 mL de tampon WASH avant d'éluer l'ADN plasmidique avec 15 mL de tampon d'élution. L'ADN est précipité avec 1 volume d'isopropanol, centrifugé 30 min à 6000 g à 4°C. Le culot est lavé avec 5 mL d'éthanol 70%, centrifugé à 6000 g, séché et resuspendu dans 200 µL tampon TRIS.

.II.2 Dosage de l'ADN

La qualité et la quantité d'ADN extrait est évaluée par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La pureté de l'ADN est confirmée si le rapport des absorbances A_{260}/A_{280} est compris entre 1,8 et 2. Un rapport A_{260}/A_{280} supérieur à 2 indique une contamination par des ARN alors qu'un rapport inférieur à 1,7 indique une contamination protéique. L'ADN est ensuite conservée à -20°C.

.II.3 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

.II.3.1 Mode opératoire

La PCR consiste à amplifier de manière spécifique et en grande quantité un fragment d'ADN par action répétée d'une ADN polymérase. Cette enzyme génère des fragments portant une

adénosine non appariée en extrémité 3', facilitant le clonage dans des vecteurs possédant une thymine non appariée aux extrémités 3'. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques qui définissent le fragment d'ADN à amplifier.

Le mélange réactionnel se fait dans un volume final de 50 µL composé de 200 µM de dNTPs (Euromedex), de tampon Taq 1X, de 0,5 U de Taq DNA polymérase (BioLabs), de 0,4 µM de chaque amorce nucléotidique et de 10 à 50 ng de matrice d'ADN. Le mélange est ensuite complété à 50 µL avec de l'eau Milli-Q stérile. Pour chaque réaction un contrôle négatif est effectué en remplaçant la matrice ADN par un volume équivalent d'eau. Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur 2720 (Applied Biosystems) selon les conditions suivantes : 5 min de dénaturation à 94°C puis 30 à 45 cycles de dénaturation (1 min à 94°C), d'hybridation (1 min à la température d'hybridation du couple d'amorces choisi pour l'amplification), d'élongation (1 min par kb à 72°C) et une élongation finale de 5 min à 72°C.

.II.3.2 Oligonucléotides

Une attention particulière doit être apportée au choix des amorces qui doivent avoir une taille d'environ 20 nucléotides et une température de fusion sensiblement identique. La température de fusion T_m se calcule de la façon suivante : $T_m = 2(A+T)+4(G+C)$.

Cela permet aux amorces de ne pas s'hybrider entre elles et de ne pas former de boucles sur elles-mêmes. La spécificité de l'amplification est conditionnée par ce choix.

Les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont présentés dans le Tableau 6. Ils sont synthétisés par Sigma Aldrich ou Eurofins Genomics.

Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés lors de cette étude pour les réactions de PCR.

Nom	Séquence 5' → 3'	Taille (pb)	Spécificité
pmxC-F	GAACAAGTCAAGCGGCAGATC	1800	Transporteurs des polymyxines
pmxC-R	CTTTCACCTTGCAGAGGCCATC		
pmxD-F	CAGGAATTTACCGAGTCTGCC	1700	
pmxD-R	GTCGCATTTCGCAAGCAGGAAG		
pmxB-F	TCCACAACCTCGAGCTAAGCC	550	polymyxine synthétases
pmxB-R	ACTTACCGCTCCAGTACTGTTC		
F1-ob1 colE	CCTGCCGTTGCGCGATG	1432	
R1-pkb1 pmxE	GAAAATAATATCAATGGCCTCTAGCAC		
DAB-F	GTGTTCGTSGGWGAYATYG	395	
DAB-R	RTTCAGCCAMGCTTTSCCG		
Leu1Pa-F	GCCGAATTCGTGCAGCAGTGG	447	
Leu1Pa-R	GTCCGGCAGCCAGCGGGC		
PmxAshunt F	TATAGAATTCCCGTGCTGGCCGTCTGGAA	1000	
PmxAshunt R	CACAAGCTTCTCCGGACGGTTCAAATAC		
ColEco-F	CGATGAATTC AAGGGGCGCACCACCATTCTGAT	1650	
ColHind-R	CGATAAGCTTAACTGGTCCAGAACGGTTACATACTGTTC		
ColB-F	CATCGAATTCAGCCTGATCTGGAGCTTG	1938	
ColB-R	GACGAAGCTTGAAGCAGAACACGTTTCA		
ColE-F	CATCGAATTCACGGGCAATATGAATTAAC	1937	
ColE-R	GACGAAGCTTCTGATCCAACCGGTACTCG		
A2gamF	AAGGCNGGCGSBGCSTAYSTGCC	300	Synthétases bactériennes
A3gamR	TTGGGBIKBCCGGTSGINCCSGAGGTG		
NRPSF	GCNGGYGGYG CNTAYGTNCC	1000	
NRPSR	CCNCGDATYTTNACYTG		
Pro3-F	CACAATCAYTAYGGYCCRTC	281	Alignement des domaines d'adénylations d'antibiotiques susceptibles d'incorporer ces acides aminés
Pro3-R	ATCMCCYGTTCGGTACATYC		
IsoL-F	CNATYCCGATCGGSARVCCG	235	
IsoL-R	AKRTTSCRTCHGGCAGCC		
Asp-F	TAYGGNCCSACVGARDC	350	
Asp-R	GCCBCKKABYTTSAYYT		
Ser2-F	GGCTATY TSAACCGTCCSGA	154	
Ser2-R	GKATTTTYACTTGRKATCAATTCG		
Arg2-F	CTGATGGM AAYATYGAAT	131	
Arg2-R	GMMGGGATCATGTAWWC		
ApraSac-F	CGATCCGCGGAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAA	1168	Cassette de résistance à l'apramycine
ApraSac-R	CGATCCGCGGCGCCATTCGCCGTCGCC		
Apra ^R -F	ATGTCATCAGCGGTGGAGTG	804	
Apra ^R -R	TCAGCCAATCGACTGGCGAG		
ColVerif-F	CCATTTTGCGAACGGCCAAGTATGGC	300 ou	Vérification de la mutagenèse
ColVerif-R	TGGATTTCGCTGCCGATCGAGAATGGC	300+1168	
ColA1-F	CGTCGGCATTCTCTCCGAGC	1206	
ColA1-R	ACTCGATCTCACCCGTC		
ColA2-F	CCGCTTAGCGGCCAC	1640	
ColA2-R	CGCAGGGAGTGACCACC		
F-H3	GTAACGCCAGGGTTTTCCAG	X	
R-H3	CTGGGAAAACCCTGGCGTTAC		
F-E1	GAAATTGTTATCCGCTCACAATTC	X	
F-E1	GAATTGTGAGCGGATAACAATTTTC		

Signification des lettres employées autres que A, C, G et T : R = A ou G, Y = C ou T, M = A ou C, S = G ou C, W = A ou T, D = G, A ou T, B = G, T ou C, H = A, T ou C, K = G ou T, V = G, A ou C, N = A, C, G, ou T.

.II.4 Électrophorèse

Les fragments d'ADN obtenus après extraction, amplification ou digestion enzymatique sont séparés par électrophorèse sur gel horizontal d'agarose (Euromedex) dans du tampon TBE 1X (Tris 1 M, acide Borique 0,9 M et EDTA 0,01 M). La concentration en agarose varie de 0,7 à

2% (m/v) selon la taille des fragments d'ADN à séparer. Le gel est préparé dans du TBE 1X puis coloré au GelGreen (Biotium) à une concentration finale de 0,5X avant solidification. Les échantillons (10 µL) sont mélangés avec 2 µL de tampon de charge (glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,1% et xylène cyanol 0,1%) puis chargés dans les puits du gel. Après dépôt des échantillons, la migration s'effectue pendant 90 min sous une tension de 100 V en présence de marqueurs de taille (GeneRuler 100 bp, 1 kb ou 1 Kb plus ; BioLabs ou Thermo Scientific). Les fragments d'ADN rendus fluorescents par le GelGreen sont visualisés sous lumière UV. Le traitement et l'analyse d'images sont réalisés avec le système ImageJ.

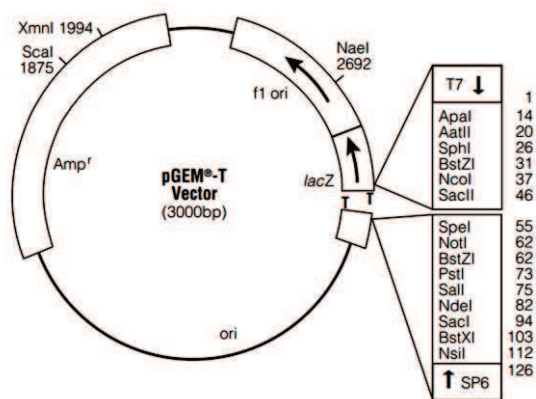
.II.5 Purification des produits PCR

Pour les réactions de séquençage et de clonage, les produits de PCR sont purifiés afin d'éliminer les différents composants du mélange réactionnel (enzyme, tampon, dNTPs, amorces, et autres impuretés). Lorsque plusieurs produits d'amplification sont obtenus, le fragment d'intérêt est découpé du gel puis purifié. Les purifications se font grâce au kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

.II.6 Techniques de clonage

.II.6.1 Ligature dans le plasmide pGEM-T

Le clonage des produits PCR est réalisé avec le kit « pGEM[®]-T Vector » (Promega). Le pGEM[®]-T (Figure 30) est fourni sous forme linéarisé avec une base thymine (T) ajoutée à chaque extrémité 3'. Beaucoup de polymérases utilisées pour les réactions d'amplifications ajoutent une base adénosine (A) à l'extrémité 3' du brin néo-synthétisé. Cela permet un clonage direct des produits de PCR dans le vecteur grâce à l'appariement entre les bases A des produits et les bases T du vecteur.



Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline codant pour la β -lactamase.

ori : origine de réplication pour son maintien dans *E. coli*.

lacZ : gène codant la β -galactosidase. Il contient le site de clonage pour l'insertion du fragment de PCR.

f1 ori : origine de réplication du phage filamenteux f1.

T7 et SP6 : localisation et direction des promoteurs des phages T7 et SP6.

Figure 30 : Carte du plasmide pGEM[®]-T.

Le ratio molaire insert : vecteur est de 3 :1. Les réactions de ligature entre insert et vecteur se font grâce à la T4 DNA ligase dans un volume final de 10 μ L contenant 1 μ L de vecteur pGEM[®]-T (50 ng), 5 μ L de tampon 2X pour l'enzyme (Rapid Ligation buffer, T4 DNA Ligase), 1 μ L de T4 DNA ligase (3 U/ μ L) et X μ L de produits PCR. Les mélanges réactionnels sont incubés une nuit à 4°C. La quantité d'insert nécessaire est calculée avec la formule suivante :

$$\text{ng insert} = \frac{\text{ng vecteur} \times \text{taille insert}}{\text{Taille vecteur}} \times \frac{\text{mole insert}}{\text{mole vecteur}}$$

.II.6.2 Préparation de bactéries compétentes JM109

Une préculture d'*E. coli* JM109 à transformer est réalisée dans 5 mL de LB pendant une nuit à 37°C sous agitation à 200 rpm. Le lendemain, 50 mL de LB sontensemencés avec 2,5 mL de la préculture puis incubés à 37°C jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600\text{nm}}$ comprise entre 0,5 et 0,6. La culture est placée 10 min dans la glace pour stopper la croissance puis centrifugée 10 min à 5000 g, à 4°C. Le culot est repris dans 10 mL de tampon RF1 froid (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, acétate de potassium 30 mM et glycérol 15% (v/v), pH ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique) puis placé dans la glace pendant 10 min. Après une seconde centrifugation de 10 min à 5000 g à 4°C, le culot est repris dans 2 mL de tampon RF2 froid (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM et glycérol 15% (v/v), pH ajusté 6,8 avec du NaOH) de façon à avoir à une concentration bactérienne de 3.10^{10} bactéries/mL. Les bactéries compétentes sont aliquotées par 100 μ L et stockées à -80°C pendant plusieurs mois sans perdre leur compétence.

.II.6.3 Transformation par choc thermique

Les bactéries compétentes (100 μ L) préalablement incubées 10 min dans la glace sont transformées avec 4 μ L du mélange de ligature. Après 30 min d'incubation dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique de 45 secondes au bain-marie à 42°C. Le tube est replacé dans la glace pendant 5 min puis 950 μ L de milieu SOC sont ajoutés. Les bactéries sont incubées 90 min à 37°C sous agitation afin d'induire la résistance à l'antibiotique. Le plasmide pGEM-T permettant une sélection blanc/bleu des clones recombinants, les bactéries sont donc étalées sur milieu gélosé LB contenant de l'ampicilline à 100 μ g/mL, du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) à 80 μ g/mL et de l'IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside) à 0.5 mM puis incubées à 37°C pendant une nuit. Le substrat X-gal est clivé par la β galactosidase et donne une coloration bleue aux colonies. L'insertion du produit PCR au site de clonage abouti à une β galactosidase non fonctionnelle ce qui donne une coloration blanche aux colonies. Ainsi seules les bactéries ayant intégré un plasmide recombinant (colonies blanches) ou non-recombinant (colonies bleues) peuvent croître.

.II.6.4 Analyse des clones recombinants

Les colonies blanches obtenues sont repiquées et leur ADN plasmidique est extrait par lyse alcaline comme décrit dans le paragraphe .II.1.2. L'ADN plasmidique des clones est analysé par PCR puis vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose. Les clones positifs sont ceux qui présentent un fragment dont la taille correspond à celle de l'insert.

.II.6.5 Séquençage des plasmides

Les plasmides sont séquencés par la société Genoscreen (Lille) ou par Eurofins Genomics, (Allemagne) selon la méthode de Sanger. Les différentes séquences obtenues sont analysées en créant des alignements avec les séquences protéiques de polymyxines connues et en réalisant des BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de comparaison avec les séquences des bases de données du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le programme ClustalW permet aussi de détecter les homologies en nucléotides ou acides aminés entre les séquences ou produits de gènes.

.II.7 Construction de banques d'ADN génomiques

Pour comprendre et maîtriser la voie de biosynthèse des composés antibiotiques produits par les souches B-LR et 32, il est nécessaire de cloner l'ensemble du cluster contenant les gènes impliqués. Ainsi, la construction d'une banque génomique est l'étape nécessaire compte tenu de la taille potentielle de ces clusters (~ 40 kb). Les banques sont construites en utilisant les systèmes pEpiFOSTM-5 (Epicentre® Biotechnologies, Madison) pour la souche B-LR et pSMART® FOS (Lucigen, Midelton USA) pour la souche 32. Ces vecteurs fosmidiques présentent l'avantage de pouvoir cloner des séquences de 35 à 45 kb de façon stable chez *E. coli*.

.II.7.1 Principe de construction

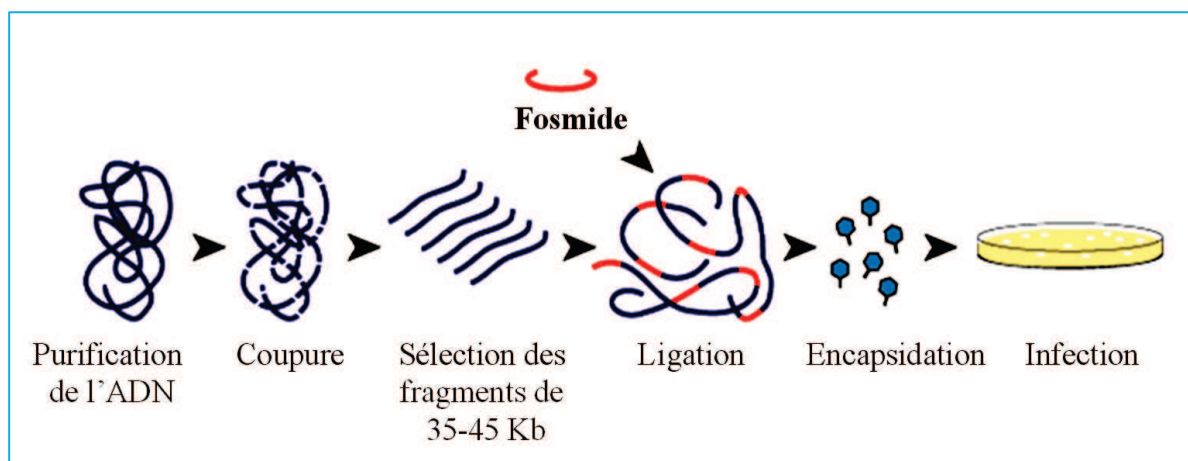


Figure 31 : Étapes de construction d'une banque fosmidique.

Une banque génomique est un ensemble de vecteurs recombinants contenant chacun un fragment d'ADN de la souche étudiée. Comme le montre la Figure 31, l'ADN génomique des souches est d'abord purifié puis digéré mécaniquement ou par voie enzymatique. Les fragments de 35-45 kb sont sélectionnés et ligaturés dans des vecteurs fosmidiques déphosphorylés. Ces vecteurs sont ensuite encapsidés *in vitro* (packaging) dans des particules de phages λ avant transfection dans les souches d'*E. coli* EPI100TM-T1^R Phage T1-Resistant pour la souche B-LR et *E. coli* Replicator FOS pour la souche 32.

.II.7.2 Extraction de l'ADN au phénol/chloroforme

Une quantité importante d'ADN génomique des souches sauvages est extrait au phénol / chloroforme : Isoamyl alcool (25/24 :1) pH8. Pour chaque souche une culture est réalisée dans 50 mL de milieu LB (200 rpm-30°C, une nuit). Les cellules sont récupérées par centrifugation 10 min à 3500 g. Le culot est repris dans 3 mL de tampon (Tris-HCl 10 mM pH7,5, NaCl 150 mM et EDTA 100 mM) pH8. Du lysozyme est ajouté à une concentration finale de 1 mg/mL ainsi que de la RNase A à une concentration finale de 100 µg/mL final. Le tout est mis à incuber à 37°C pendant 30 min pour lyser les parois bactériennes. Du SDS à une concentration finale de 1% et de la protéinase K à une concentration finale de 200 µg/mL sont ensuite ajoutés pour dissocier les protéines associées à l'ADN. Après 60 min d'incubation à 42°C, les protéines sont précipitées par l'ajout de 5 mL de phénol/chloroforme (25/24). Le phénol et le chloroforme sont des solvants organiques qui dénaturent les protéines et sont non miscibles à l'eau. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse (supérieure) qui est récupérée après centrifugation. Après 10 min de centrifugation à 3500 g, la phase supérieure est récupérée et est additionnée de 5 mL de phénol/chloroforme. Le mélange est à nouveau centrifugé et la phase supérieure est récupérée. Une dernière étape d'extraction est faite en ajoutant uniquement 5 mL de chloroforme : isoamyl alcool (24 :1) sur la phase aqueuse pour éliminer les traces de phénol. La phase aqueuse est récupérée, et l'ADN est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu. Après 30 min de centrifugation à 21000 g, le culot d'ADN est séché à l'air libre et repris dans 250 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8).

.II.7.3 Fragmentation de l'ADN génomique

Deux techniques de fragmentation ont été testées. L'ADN génomique de la souche B-LR purifié est fragmenté par digestion enzymatique partielle avec l'enzyme de restriction *Bam*HI. L'enzyme est diluée au 50^{ème} dans du tampon 3.1 (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 100 µg/mL, pH7,9). Le mélange réactionnel est le suivant :

10 µg	ADN de la souche B-LR	} 37°C, 1 Heure
5 µL	Tampon 3.1	
1 µL	<i>Bam</i> HI 1/50 ^{ème}	
x µL	Eau stérile	
<u>50 µL</u>		

L'ADN génomique de la souche 32 est coupé mécaniquement avec une pipette de 200 μL . Des essais de coupures mécaniques sont réalisés par 200, 500 et 1000 aller-retours à la pipette. La taille de l'ADN coupé est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

.II.7.4 Réparation de l'ADN

Chaque ADN fragmenté est réparé afin de générer des extrémités franches avec un groupement phosphate en 5' pour faciliter la ligation avec le fosmide déphosphorylé. La réaction se fait dans un volume final de 50 μL selon les conditions suivantes :

10 μg	ADN de la souche B-LR digéré	10 μg	ADN de la souche 32 digéré
6 μL	Tampon de réparation (Epicentre)	10 μL	Tampon de réparation (Lucigen)
6 μL	Enzyme de réparation (Epicentre)	2 μL	Enzyme de réparation (Lucigen)
6 μL	dNTP 2,5 mM	x μL	Eau stérile
6 μL	ATP 10 mM	50 μL	Volume total
x μL	Eau stérile		
50 μL	Volume total		

Pour la souche B-LR, le milieu est incubé 30 min à 37°C puis l'enzyme de réparation est inactivée par chauffage 15 min à 70°C.

Pour la souche 32, le milieu est incubé 45 min à température ambiante puis 8 μL de tampon de charge (paragraphe .II.4 p. 82) sont ajoutés avant de stopper la réaction à 70°C pendant 10 min.

.II.7.5 Sélection des fragments de 35-45 Kb

Chaque ADN réparé est déposé sur un gel d'agarose de type Low Melting Point (0,7%, 20 cm, 150 mL). La migration s'effectue pendant 21 h sous une tension de 60 V. Après migration les puits extérieurs du gel contenant les marqueurs de tailles sont coupés, colorés au GelGreen puis visualisé aux rayons UV pour repérer les positions des marqueurs. Le gel est ensuite rassemblé puis coupé sur une largeur de 2-4 mm contenant l'échantillon d'ADN qui a migré dans la région entre 35 et 50 kb.

Un traitement à l'agarase est ensuite effectué : chaque morceau de gel récupéré est fondu à 65°C pendant 10 min puis refroidi à 42°C. Une unité de β -agarase (Euromedex) est ajoutée pour 100 mg d'agarose fondu. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 42°C, puis l'agarase est inactivée par chauffage 10 min à 70°C.

Chaque ADN est ensuite précipité par ajout dans le milieu réactionnel de 1/10 de volume d'acétate de sodium (3 M, pH7) et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après 15 min de centrifugation à 41000 g, le culot est lavé avec 2 volumes d'éthanol 70%, séché et dissout dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8).

.II.7.6 Préparation du vecteur pEpiFOS™ (banque B-LR)

L'ADN génomique de la souche B-LR étant digéré partiellement par l'enzyme de restriction *Bam*HI, le fosmide pEpiFOS™-5 (Figure 32) utilisé pour cette banque est aussi digéré avec *Bam*HI. Après digestion, l'ADN fosmidique est précipité par ajout de 1/10 de volume d'acétate de sodium (3 M, pH7) et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après 15 min de centrifugation à 41000 g, l'ADN est repris dans 10 µL d'eau stérile. Le fosmide digéré et précipité est traité avec de la phosphatase alcaline (Biolabs, selon les recommandations du fournisseur) de manière à éviter une ligature du fosmide sur lui-même. Une fois déphosphorylé, il est de nouveau précipité, centrifugé et repris dans 5 µL d'eau.

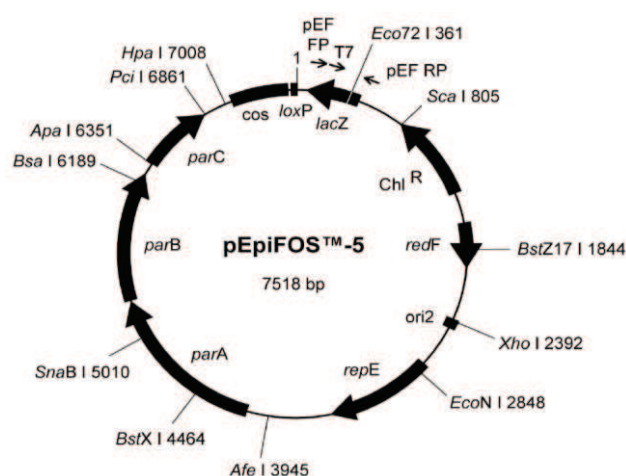


Figure 32 : Carte du fosmide pEpiFOS™-5.

parABC : système de partition du plasmide F.

repE : facteur d'initiation intervenant dans l'assemblage du complexe de réplication au niveau de l'origine de réplication.

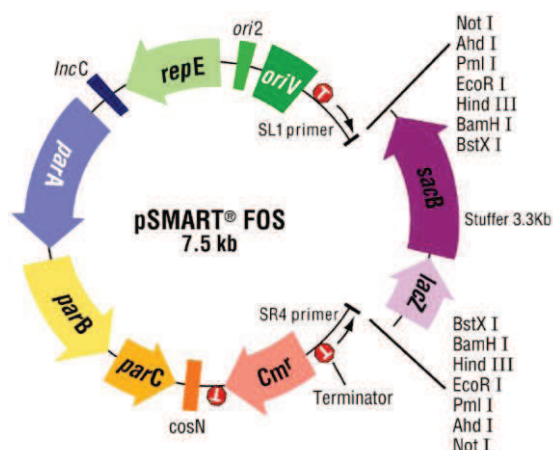
ChlR : gène de résistance au chloramphénicol.

lacZ : gène codant la β -galactosidase.

cos : éléments cos des phages lambda pour l'encapsulation.

ori2 : origine de réplication simple copie.

loxP : sites de recombinaison du phage P1.



parABC : système de partition du plasmide F.

ChlR : gène de résistance au chloramphénicol.

lacZ : gène codant la β -galactosidase.

sacB : gène de saccharose synthase.

cosN : signal pour le lambda packaging.

ori2 : origine de réplication simple copie.

oriV : origine de réplication inducible.

Figure 33 : Carte du fosmide pSMART-FOS.

.II.7.7 Ligation

La ligation est réalisée entre les inserts récupérés du gel (ADN de la souche B-LR) et le vecteur pEpiFOSTM-5 digéré par *Bam*HI et déphosphorylé ou entre les inserts récupérés du gel (ADN de la souche 32) et le vecteur pSMART-FOS (Figure 33). La DNA ligase est utilisée pour les réactions de ligations et le ratio molaire vecteur : insert est de 10:1 pour chaque couple vecteur-insert. Les mélanges réactionnels sont incubés 3 h à température ambiante avant d'inactiver la ligase par chauffage 15 min à 70°C.

0,25 μ g	ADN insert B-LR	0,25 μ g	ADN insert 32
1 μ L	Tampon de ligation (Epicentre)	1 μ L	Tampon de ligation (Lucigen)
1 μ L	ATP 10 mM	1 μ L	Vecteur pSMART-FOS
1 μ L	Vecteur pEpiFOS TM -5	1 μ L	CloneSmart DNA Ligase (Lucigen)
1 μ L	Fast-Link DNA Ligase (Epicentre)	x μ L	Eau stérile
x μ L	Eau stérile	50 μ L	Volume total
10 μ L	Volume total		

.II.7.8 Encapsidation des produits de ligation

Le produit de ligation du vecteur pEpiFOSTM-5 est encapsidé avec 25 μ L d'extrait de phage MaxPlax λ (Epicentre). Le mélange est incubé 90 min à 30°C. Après incubation le milieu réactionnel est complété avec 25 μ L d'extrait de phage puis incubé 90 min à 30°C. La réaction d'encapsidation est stoppée par addition de 500 μ L de tampon de dilution des phages (Tris-HCl

10 mM pH 8,3, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM) et 20 µL de chloroforme avant conservation à 4°C.

Le produit de ligation du vecteur pSMART-FOS est encapsidé avec 25 µL d'extrait de phage Gigapack III XL (Agilent) puis incubé 90 min à température ambiante. Après incubation, la réaction d'encapsidation est stoppée par addition de 500 µL de tampon SM (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M, MgSO₄·7H₂O 8 mM, gélatine 0,01%) et 20 µL de chloroforme avant conservation à 4°C.

.II.7.9 Infection des bactéries

.II.7.9.1 Infection des cellules *E. coli* EPI100-T1R

La culture d'*E. coli* EPI100-T1R à infecter est réalisée en inoculant 50 mL de LB (10 mM de MgSO₄) avec 5 mL de préculture de cette souche. Les cellules sont placées à 37°C sous agitation à 200 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} comprise entre 0,8 et 1.

Un volume de 10 à 50 µL du mélange d'encapsidation (phage MaxPlax λ) est incubé avec 100 µL de cellule *E. coli* EPI100-T1R à 37°C sous agitation à 220 rpm pendant 20 min pour permettre l'adsorption des phages sur les cellules. Les cellules infectées sont ensuite étalées sur boîtes LB contenant du chloramphénicol à 12,5 µg/mL, et incubées à 37°C pendant 30 h. Les clones recombinants obtenus (banque B-LR) sont mis en culture liquide dans des plaques de microtitration de 96 puits, puis stockés à -20 et -80°C.

.II.7.9.2 Infection des cellules *E. coli* Replicator FOS

La culture des bactéries Replicator FOS à infecter est réalisée en inoculant 50 mL de LB (0,2 % de maltose et 10 mM de MgSO₄) avec 0,5 mL de préculture de cette souche. Le maltose permet d'induire l'opéron maltose qui contient le gène *lamB* qui code des récepteurs de ce sucre. C'est sur ces récepteurs que s'adsorbent les phages λ (gigapack). Le MgSO₄ permet une adsorption optimale des phages. La culture est incubée à 37°C sous agitation à 200 rpm jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,8 et 1. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 3000 g à 4°C pendant 10 min, puis resuspendues dans 17 mL de LB/Maltose (0,2 %)/MgSO₄ (10 mM)

Un volume de 10 µL du mélange d'encapsidation (Gigapack III XL) est incubé avec 100 µL de Replicator FOS à 37°C sous agitation à 220 rpm pendant 20 min. Les cellules infectées sont ensuite étalées sur boîtes YT-CXIS (Chloramphénicol à 12,5 µg/mL, X-gal à 40 µg/mL, IPTG à

0.4 mM et Sucrose à 5%). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant deux jours, puis les clones recombinants obtenus (banque 32) sont cultivés en milieu liquide TB additionné de chloramphénicol à 12,5 µg/mL dans des plaques de microtitration de 96 puits, puis stockés à -20 et -80°C.

.II.8 Criblage de la banque B-LR

La banque génomique de B-LR est criblée par PCR dégénérées sur colonies. La composition en acides aminés (aa) des molécules antibiotiques de B-LR étant connue, des amorces dégénérées permettant d'amplifier les régions conservées de certains domaines d'adénylations de ces aa sont donc utilisés.

.II.8.1 Utilisation d'amorces dégénérées

Contrairement aux amorces non dégénérées qui sont constituées uniquement de combinaison de bases nucléiques A, T, G et C, les amorces dégénérées comportent dans leurs séquences des bases nucléiques capables de substituer 2, 3, ou 4 autres bases nucléiques. Ainsi un tube d'oligonucléotide dégénéré contient plusieurs séquences nucléotidiques possibles, ce qui permet de reconnaître plusieurs fragments. Le code DNA IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) est utilisé pour introduire les dégénérescences dans les séquences des amorces.

Dans un premier temps, la banque est criblée avec un couple d'amorce spécifique des domaines d'adénylations impliqués dans l'incorporation de l'acide L-2,4-diaminobutyrique (L-Dab). Les clones donnant un produit d'amplification de la taille attendu sont sélectionnés et constituent un pool positif. Ensuite le criblage de ces clones positifs est affiné avec d'autres domaines d'adénylations supposés présents dans les composés antibiotiques produits par B-LR. L'utilisation d'amorces dégénérées nécessite une phase d'optimisation des conditions d'amplifications. Ces conditions (température optimale d'hybridation des amorces, quantité d'ADN) sont optimisées en utilisant l'ADN génomique de la souche B-LR qui constitue un témoin positif pour la suite.

.II.8.2 PCR dégénérées sur colonies

Afin d'identifier le contenu fosmidique des colonies bactériennes de la banque, des amplifications par PCR sont réalisées directement sur ces colonies. Comme le montre la Figure

34, la banque sous forme de microplaques de 96 puits est d'abord repiquée avec un réplicateur 96 picots stérile dans des plaques sans puit Omnitray 86×128 mm contenant du milieu solide LB chloramphénicol (12,5 µg/mL). Les plaques sont ensuite incubées 1 nuit à 37°C. Les colonies sont prélevées avec le réplicateur puis plongées dans des plaques PCR de 96 puits contenant 60 µL d'eau Milli-Q stérile dans chaque puits. Ces plaques sont ensuite couvertes avec un film transparent « Adhesive Plate Seals » (Thermo Scientific) et incubées 5 min à 94°C afin de lyser les membranes des bactéries et de libérer l'ADN. Pour un couple d'amorce donné, le mix PCR est préparé pour chaque plaque de 96 puits dans le but de tester l'ensemble des clones de la banque. 40 µL de mix (200 µM de dNTPs, tampon Taq 1X, 0,5 à 1 unité de Taq DNA polymérase, 0,4 µM de chaque amorce nucléotidique (Tableau 6 p. 82)) sont introduit dans chaque puits avant d'ajouter 10 µL de suspension bactérienne par puits. Les conditions d'amplifications dépendent de la température de fusion (T_m) de chaque couple d'amorce ainsi que de la longueur de la molécule d'ADN à synthétiser. Les fragments générés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) 96 puits. Les clones positifs sélectionnés et validés sont remis en culture dans du milieu LB chloramphénicol (12,5 µg/mL) et stockés en double exemplaire à -80°C dans des tubes glycérolés.

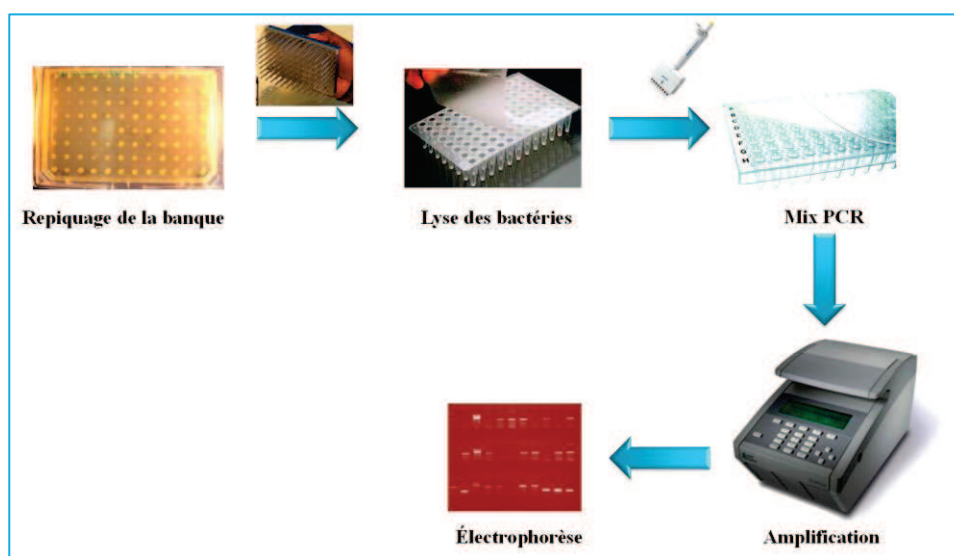


Figure 34 : Schéma général du criblage de la banque B-LR.

.II.8.3 Digestion enzymatique des fosmides

Les fosmides sélectionnés sont extraits puis digérés avec les enzymes de restriction *Bam*HI, *Bst*XI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Pm*LI, *Sca*I et *Xho*I (BioLabs). Les digestions se font 1 h à 37°C en

présence d'une unité d'enzyme par μg d'ADN fosmidique et dans le tampon recommandé par le fournisseur.

.II.8.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Après digestion, la taille des inserts des clones d'intérêts est vérifiée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Développées par Schwartz et Cantor en 1984, les techniques d'électrophorèse en champ pulsé permettent en alternant l'orientation du champ électrique au cours du temps dans le gel, de faciliter la migration des molécules d'ADN de grande taille. Chaque produit de restriction (20 ou 50 μL) est additionné d'un cinquième de volume de tampon de charge (paragraphe .II.4) et déposé sur le gel. La PFGE est réalisée dans une cuve (CHEF-DR III, Bio-Rad) sur gel d'agarose à 1% (Pulsed Field Certified Agarose Bio-Rad) selon les conditions suivantes : tampon TBE (Tris 1 M, acide Borique 0,9 M et EDTA 0,01 M) 0,5X, 16 h de migration à 14°C, 6 V/cm, avec des paramètres de pulses initiaux et finaux de 0,1 s et 2 s respectivement et un angle de 120°C. La migration s'effectue en présence de marqueurs de taille « Lambda Mix Marker 19, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker » (Thermo Scientific). Le gel est ensuite visualisé sous UV après coloration au GelGreen pendant 30 min.

.II.8.5 Séquençage des clones

Le pyroséquençage des fosmides est effectué grâce à la technologie Roche 454 GS FLX par la société Eurofins Genomics (Allemagne).

.II.8.6 Analyse *in silico*

La détection des cadres ouverts de lectures est effectuée avec le logiciel ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). L'analyse *in silico* des séquences pour retrouver les modules NRPS est réalisée avec les logiciels de prédiction en ligne (<http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de/>, <http://antismash.secondarymetabolites.org/> et <http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>).

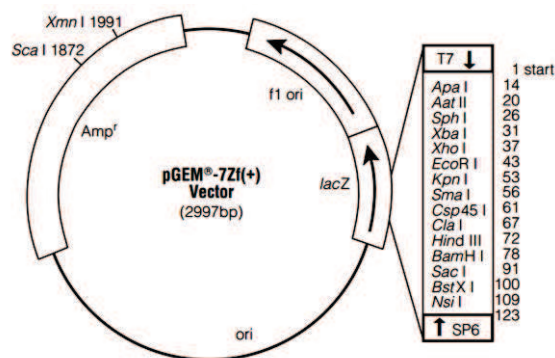
.II.9 Mutagenèse insertionnelle

Pour la mutagenèse, les réactions de ligations entre insert et vecteur se font grâce au mix « Instant Sticky-end Ligase Master Mix » (BioLabs). Le ratio molaire insert : vecteur est de

3 :1. Les mélanges réactionnels sont ensuite directement utilisés pour transformer les bactéries compétentes *E. coli* JM109 (paragraphe .II.6.2 p. 84).

.II.9.1 Inactivation du gène *colE*

La technique de mutagenèse insertionnelle est utilisée pour inactiver le gène *colE*. Un fragment de 1650 pb du gène *colE* est amplifié par PCR avec les amorces ColEco-F (5'-CGATGAATTCAAGGGGCGCACCACTTCTGAT-3') et ColHind-R (5'-CGATAAGCTTAAGTGGTCCAGAACGGTTACATACTGTTC-3') à partir de l'ADN génomique de la souche B-LR en créant les sites de restrictions respectifs *EcoRI* et *HindIII* en amont et en aval du fragment de *colE*. Après digestion enzymatique, le fragment est cloné dans le plasmide pGEM-7Zf(+) (Promega, Figure 35) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restrictions. Ce clonage donne le plasmide recombinant pGEM-7ZΔE. Une digestion par l'enzyme de restriction *SacII* permet d'introduire au centre de l'insert une cassette portant le gène de résistance à l'apramycine. Cette cassette de résistance à l'apramycine est amplifiée avec les amorces ApraSac-F (5'-CGATCCGCGGAGTGGAACGAAACTCACGTTAA-3') et ApraSac-R (5'-CGATCCGCGGCGCCATTCGCCGTCCGCC-3') à partir du plasmide pOJ260 puis digérée avec l'enzyme *SacII* et intégrée au niveau du site de restriction *SacII* de l'insert. Le plasmide obtenu, nommé pGEM-7ZΔE-Apra^R est introduit dans la souche B-LR par électroporation (paragraphe .II.9.1.1). Ce vecteur suicide n'ayant pas la capacité de se répliquer dans le *Paenibacillus* B-LR, seule son intégration dans le génome de la bactérie est possible.



Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline codant pour la β-lactamase.

ori : origine de réplication pour son maintien dans *E. coli*.

lacZ : gène codant la β-galactosidase. Il contient le site de clonage pour l'insertion du fragment de PCR.

f1 ori : origine de réplication du phage filamenteux f1.

T7 et SP6 : localisation et direction des promoteurs des phages T7 et SP6.

Figure 35 : Carte du plasmide pGEM-7Zf(+).

.II.9.1.1 Transformation du *Paenibacillus* B-LR

La transformation de la souche B-LR se fait par électroporation. Une préculture du *Paenibacillus* B-LR est réalisée dans 3 mL de milieu BHIS (BHI contenant 10% de sucrose) pendant une nuit à 30°C sous agitation à 200 rpm. Le lendemain, 200 mL de BHIS sont ensemencés avec 2 mL de préculture puis incubés à 30°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5. La culture est placée 10 min dans la glace puis centrifugée 10 min à 6000 g, à 4°C. Deux tampons de lavage sont testés :

- **Tampon « SMg »**

Le culot est lavé deux fois avec un volume de tampon SMg froid (Sucrose 10%, $MgCl_2$ 1 mM) puis repris dans ce tampon de façon à avoir une concentration de 10^{10} cellules/mL.

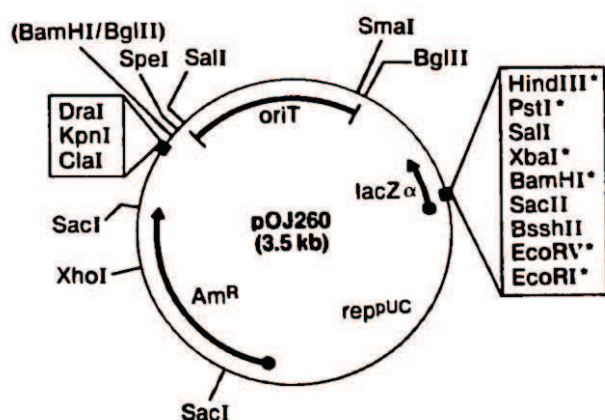
- **Tampon « HEPES »**

Le culot est lavé deux fois avec un volume de tampon HEPES froid (Sucrose 250 mM, HEPES 1 mM pH7, $MgCl_2$ 1 mM, glycérol 10%) puis repris dans ce tampon de façon à avoir une concentration de 10^{10} cellules/mL.

L'électroporation est réalisée avec l'appareil MicroPulserTM (BioRad), qui en appliquant un champ électrique permet de déstabiliser les membranes cellulaires dans le but de faire rentrer l'ADN exogène dans les cellules. Un volume de 300 μ L de cellules B-LR électro-compétentes (HEPES ou SMg) est mélangé avec 0,1 à 1 μ g de plasmide pGEM-7Z Δ E-Apra^R. Le mélange est introduit dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm d'espacement (Dominique Dutscher) préalablement refroidie à 0°C. Le mélange est laissé 5 min dans la glace puis soumis à un choc électrique (2,5 à 3 kV/cm, 1 pulse) dans l'électroporateur. Les cellules sont ensuite reprises dans 1 mL de BHIS préchauffé et incubées 2 h à 30°C sous agitation à 200 rpm. La sélection des mutants ayant subi un évènement de double recombinaison est effectuée sur milieu gélosé LB ou TSA contenant 30 μ g/mL d'apramycine (1 nuit à 30°C). Les clones résistants obtenus sont analysés par PCR afin de vérifier l'inactivation du gène. Les amorces utilisées pour ces vérifications sont ColEco-F et ColHind-R ainsi que ColVerif-F (5'-CCATTTTGC GAACGGCCAAGTATGGC-3') et ColVerif-R (5'-TGGATTTCGCTGCCGATCGAGAATGGC-3').

.II.9.2 Inactivation du gène *colA*

La stratégie utilisée pour inactiver le gène *pmxA* est la suivante : un fragment de 1000 pb du gène *colA* est amplifié par PCR avec les amorces PmxAshunt-F (5'-TATAGAATTCCCGTGCTGGCCGTCTGGAA-3') et PmxAshunt-R (5'-CACAAAGCTTCTCCGGACGGTTCAAATAC-3') à partir de l'ADN génomique de la souche B-LR en créant les sites de restrictions respectifs *EcoRI* et *HindIII*. Après digestion enzymatique, le fragment est ligué dans le plasmide pOJ260 (Figure 36) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restrictions puis introduit dans les bactéries compétentes *E. coli* JM109 (paragraphe .II.6.2 p. 84). Ce clonage donne le plasmide recombinant pOJ260ΔAshunt. Ce plasmide est ensuite introduit dans la souche B-LR par électroporation comme décrit dans le paragraphe .II.9.1.1. La sélection des mutants ayant subi un événement de recombinaison est effectué sur milieu gélosé LB contenant 30 µg/mL d'apramycine (1 nuit à 30°C). Les clones résistants obtenus sont analysés par PCR afin de vérifier l'inactivation du gène.



Am^R : gène codant l'apramycine acétyltransférase qui confère la résistance à l'apramycine.

oriT : origine de transfert du plasmide RK2.

lacZα : gène codant la β-galactosidase.

rep^{pUC} : origine de réplication du plasmide.

Figure 36 : Carte du plasmide pOJ260 (d'après Bierman *et al.*, 1992).

III TECHNIQUES D'ANALYSE DES MOLÉCULES

.III.1 Préparation des échantillons

Les précultures de la souche B-LR et des mutants sont réalisées dans 10 mL de BN (additionnés d'antibiotique pour les mutants) pendant une nuit à 30°C sous agitation à 200 rpm. La

préculture est centrifugée 10 min à 3000 g à 4°C. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension et lavées deux fois dans du milieu de culture. 200 mL de milieu de culture sont ensemencés à une DO_{600nm} de 0,1 avec la préculture puis incubés sous agitation (200 rpm-30°C, 48 h). Après culture, le surnageant est récolté par centrifugation 20 min à 11000 g à 4°C. Le surnageant est chauffée 10 min dans un bain marie à 100°C pour éliminer les éventuelles bactéries résiduelles. Un aliquote de 1 mL est prélevé pour réaliser un test antimicrobien de contrôle simple couche (Figure 29). Après refroidissement à température ambiante dans le noir, le surnageant est traité de deux manières différentes :

- Le surnageant est soit congelé directement à -20°C (**1X**).
- Soit versé dans des cristallisoirs et congelé 72 h à -80°C. Dans ce cas, le surnageant est lyophilisé pendant 48 h à une pression comprise entre 0,10 et 0,070 mbar (lyophilisateur CHRIST® BETA 1-8 LD_{plus}, Thermo Fisher Scientific). Le lyophilisat obtenu est ressuspendu dans 10 mL d'eau Milli-Q stérile, aliquoté dans des tubes Eppendorf puis stocké à -20°C (**20X**).

Avant analyse, le surnageant est décongelé, centrifugé 20 min à 11000 g puis filtré sur une membrane de 0,22 µm (Minisart®, sartorius stedim).

.III.2 Purification des molécules par Extraction Sur Phase solide (SPE)

.III.2.1 Principe

L'extraction sur phase solide (SPE, Solid Phase Extraction) est une technique de traitement des échantillons liquides avant analyse. Elle est basée sur la distribution des composés entre la phase liquide qui représente l'échantillon et la phase solide qui est l'adsorbant choisi. Elle se déroule généralement en quatre étapes : le conditionnement de l'adsorbant, le chargement de l'échantillon, les lavages de la colonne et enfin l'élution. Ainsi une fois déposés, les composés sont récupérés par élution avec un solvant organique dont l'affinité avec les molécules adsorbées est suffisante pour les décrocher. L'extraction se fait avec une cartouche Oasis® HLB composé d'un macropolymère qui allie des caractéristiques de rétention lipophiles grâce au divinylbenzène et hydrophiles grâce au N-vinylpyrrolidone. Elle est utilisable pour tous types de composé avec une stabilité de pH allant de 0 à 14.

Cette technique a été développée par Antoine Bonnet et Anne-Laure Gagez de la Plateforme d'Analyse Haute Résolution de Biomolécules de l'Université de La Rochelle.

La SPE a été optimisée en utilisant d'abord de la colistine sulfate (Sigma-Aldrich) préparée dans du milieu de culture (M63T) à une concentration de 2 mg/l et en testant plusieurs gradients d'élutions jusqu'à l'obtention d'un gradient adéquat (bonne séparation des molécules). Avant de charger l'échantillon, la colonne Oasis[®] HLB (1 mL-30 mg, Waters) est d'abord conditionnée avec 1 mL de méthanol 100% élué sur la colonne puis 1 mL d'eau Milli-Q 100%. Les éluats ne sont pas récupérés pour le conditionnement. 1 mL d'échantillon (surnageant ou colistine à 2 mg/mL filtré) sont chargés ensuite sur la colonne Oasis[®] HLB préalablement conditionnée. La fraction chargée est collectée dans un tube (Fraction 1). La colonne est ensuite lavée avec 1 mL d'eau Milli-Q pour éliminer les sels et autres impuretés du milieu de culture. La fraction de lavage est collectée dans un tube (Fraction 2). La colonne est ensuite éluee en deux étapes : avec 1 mL d'un mélange (80/20, v/v) méthanol/eau+2% d'acide formique puis avec 1 mL de méthanol 100%. Les éluats sont récupérés dans 2 tubes (Fractions 3 et 4). 200 µL de chaque fraction sont transférés dans un vial pour être analysé par Chromatographie Liquide Ultra Performante (UPLC). Le reste (800 µL) est directement congelé à -20°C.

.III.3 Étude des molécules par Chromatographie Liquide Ultra Performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/MS)

.III.3.1 Principe

La Chromatographie Liquide Ultra Performante (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) est une technologie développée par Waters corporation qui s'appuie sur les principes de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) classique tout en améliorant la sensibilité, la résolution chromatographique et la vitesse d'analyse. Cette technologie utilise des colonnes capables de résister à de très hautes pressions. Ces colonnes contiennent des phases stationnaires composées de petites particules de 1,7 µm de diamètre (contre 3 à 5 µm en HPLC classique). Cette diminution de la granulométrie permet d'utiliser des gammes de débit plus large ce qui induit une augmentation des vitesses d'analyse sans altérer les performances

chromatographiques. Les composés séparés par UPLC sont ensuite directement détectés par spectrométrie de masse (Mass Spectrometry, MS).

La spectrométrie de masse est une technique de détection très puissante et très sensible qui permet d'obtenir la masse moléculaire d'un composé par analyse du rapport masse/charge (m/z) et de corrélérer son spectre de masse avec sa structure chimique. Un spectromètre de masse est composé de plusieurs éléments : une source d'ionisation, un ou plusieurs analyseurs de masse, un détecteur et un enregistreur. Après séparation des composés par UPLC, une source d'ionisation par électrospray (Electrospray Ionisation, ESI) va permettre d'ioniser les molécules de l'échantillon à analyser et de transférer les ions vers l'analyseur. Ce dernier va ensuite séparer les différents ions générés dans la source en fonction de leur rapport m/z dans un champ magnétique ou électrique. Enfin, le détecteur collecte et dénombre les ions en sortie de l'analyseur. L'enregistreur permet de traiter le signal et de convertir les données en spectres de masse et/ou en chromatogrammes lors d'un couplage avec une technique chromatographique. Dans cette étude, le procédé d'ionisation se fait en mode positif ce qui conduit à la formation d'ions mono-chargés de type $[M+H]^+$ mais également à des ions multichargés $[M+nH]^{n+}$.

.III.3.2 Conditions d'analyse

Les analyses sont effectuées sur un chromatographe liquide Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé à un spectromètre de masse Xevo G2-S QTOF comprenant une source d'ionisation par électrospray (Waters, Manchester, Royaume-Uni) équipée du système Lockspray. Ce spectromètre est composé d'un quadripôle fonctionnant en mode transmission, suivie d'une cellule de collision et d'un analyseur à temps de vol de nouvelle génération QUANTOF. Le système chromatographique est composé d'une pompe quaternaire (Quaternary Solvent Manager, Waters) et d'un injecteur automatique thermostaté (Sample Manager-FTN, Waters).

La colonne utilisée pour séparer les composés contenus dans les fractions d'intérêt est de type phase inverse Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm; 1,7 μ m; 130 Å) et sa température est optimisée à 25°C. Le volume d'injection est de 5 μ L et la température des échantillons est contrôlée à 4°C. La phase mobile permettant la séparation des composés est un mélange binaire eau/0,1% d'acide formique (Éluant A) et acétonitrile/0,1% d'acide formique (Éluant B). Le gradient d'élution est présenté dans le Tableau 7. La séparation se fait à 25°C avec un débit de phase mobile fixé à 0,4 mL/min.

Tableau 7 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des composés des surnageants purifiés par SPE sur le système UPLC/MS.

Temps (minutes)	Éluant A (%)	Éluant B (%)
0	97	3
0,20	97	3
0,25	80	20
1,50	73	27
1,55	0	100
3,45	0	100
3,55	97	3
5	97	3

Éluant A : eau+0,1% acide formique et Éluant B : acétonitrile +0,1% acide formique.

Les paramètres utilisés en spectrométrie de masse sont présentés dans le Tableau 8. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel MassLynxTM (version 4.1, Waters Corporation).

Tableau 8 : Paramètres d'ionisation et de détection utilisés en MS.

Paramètres	Réglages
Source d'ionisation	Electrospray en mode positif
Voltage du capillaire	2500 V
Température de la source	120°C
Température du gaz de désolvatation (N ₂)	500°C
Débit du gaz de désolvatation	1000 L/heure
Débit du gaz de collision	50 L/heure
Gamme de masse	50 à 1500 m/z
Mode d'acquisition	Full Scan et MS ^E

.III.3.3 Spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS)

La spectrométrie de masse en mode tandem ou MS/MS est utilisée pour déterminer l'enchainement des acides aminés grâce à la fragmentation de la liaison peptidique. Ce mode consiste à combiner deux analyseurs séparés par une cellule de collision. Une première étape consiste à sélectionner un ion issu de la source d'ionisation dans le quadripôle : c'est l'ion

parent ou précurseur. Cet ion subit une fragmentation dans la cellule de collision sous l'effet d'un bombardement par des atomes d'argon et donne des ions fils ou produits qui seront analysés et détectés par l'analyseur à temps de vol (Time of Flight, TOF). L'analyseur TOF est basé sur la mesure du temps que met les ions à parcourir une distance donnée, ce qui permet de détecter les rapports m/z et donc de déterminer la masse des ions correspondants.

En mode tandem le volume d'injection est de 10 μL et les paramètres utilisés sont présentés dans le Tableau 9. Les acquisitions sont effectuées en mode balayage sur une gamme de rapports m/z allant de 50 à 1500.

Tableau 9 : Paramètres d'ionisation et de détection utilisés en MS/MS.

Paramètres	Réglages
Source d'ionisation	Electrospray en mode positif
Voltage du capillaire	2500 V
Température de la source	120°C
Température du gaz de désolvatation (N_2)	500°C
Débit du gaz de désolvatation	1000 L/heure
Débit du gaz de collision	50 L/heure
Rampe d'énergie de collision	40-50 V (mono-chargés) 15-25 V (di-chargés)
Sampling cone	35 V
Source offset	85 V
Mode d'acquisition	MS/MS

Résultats et Discussion

Lors de travaux antérieurs, deux micro-organismes appartenant à la famille des *Paenibacillus* ont été isolés par l'équipe. Le premier, appelé souche « 32 » provient d'une expectoration d'un malade atteint de mucoviscidose (thèse Romain Chevrot). Le deuxième appelé B-LR a été isolé à partir d'eau de mer (Master recherche Fatoumata Tambadou).

Ces deux micro-organismes ont été sélectionnés en raison de l'activité antimicrobienne de leurs surnageants de culture.

Celui de la souche « 32 » a inhibé la croissance de tous les micro-organismes à Gram positif que nous avons pu tester, ainsi que la croissance de levures et de moisissures (Chevrot *et al.*, 2013 en annexe1) (Tableau 10 p. 106). Après fractionnement par HPLC, un peptide de 786.6 Da impliqué dans cette activité antimicrobienne a pu être purifié et caractérisé par spectrométrie de masse basse résolution. Cette nouvelle molécule appelée depsipeptide L, serait constituée d'une partie acyle comportant un acide 15-guanidino-3-hydroxypentadécanoïque, et d'une partie peptidique cyclique de quatre acides aminés (Ser-Leu/Ile-Leu/Ile-Arg) (Figure 37). Le depsipeptide L partagerait donc des homologies de structures avec les fusaricidines. La partie acyle serait commune aux deux molécules alors que les parties cycliques seraient différentes. En effet, les fusaricidines incorporent six acides aminés contre quatre dans le depsipeptide L.

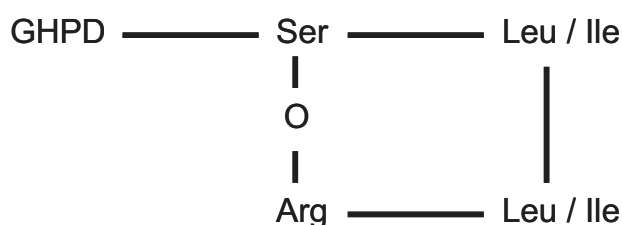


Figure 37 : Structure du depsipeptide L produit par la souche 32 (m/z 786.6).

GHPD = Acide 15-guanidino-3-hydroxypentadécanoïque, Ser = Sérine, Leu = Leucine, Arg = Arginine et Ile = Isoleucine.

Le surnageant de culture de la bactérie B-LR a présenté un spectre d'activité entièrement différent. Ce sont majoritairement les bactéries à Gram négatif qui ont été inhibées (Tableau 10 p. 106). Parmi elles on retrouve de nombreux micro-organismes pathogènes dont des *Pa.* En revanche le surnageant de B-LR n'a pas d'activité sur les souches de *Providencia sp.*, *Proteus sp.*, et *Serratia sp.*, naturellement résistantes aux polymyxines. Ce spectre ressemble à celui de la colistine (polymyxine E). Après fractionnement et purification de ce

surnageant, des molécules antimicrobiennes partageants des homologies avec les polymyxines ont pu être caractérisées de façon préliminaire par spectrométrie de masse basse résolution.

Tableau 10 : Spectres d'activités antimicrobiennes des surnageants de culture des souches « 32 », « B-LR » et de la colistine (5 µg).

	« 32 »	« B-LR »	Colistine (5 µg)	Origine
Bactéries à Gram positif				
<i>Bacillus cereus</i>	+++	0	0	Coll. Lab
<i>Bacillus megatherium</i>	+++	+++	ND	Coll. Lab
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	++	Coll. Lab
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	0	0	Coll. Lab
<i>Listeria innocua</i>	++	0	0	Coll. Lab
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	+	++	Coll. Lab
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25823	+++	+	+	Coll. Lab
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP53154	+++	+	++	Coll. Lab
<i>Staphylococcus aureus</i> IUT	+++	+	++	Coll. Lab
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+++	+++	+++	Coll. Lab
Bactéries à Gram négatif				
<i>Achromobacter</i> sp.	0	+	ND	Coll. Lab
<i>Citrobacter freundii</i>	+++	+++	++	Coll. Lab
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	++	++	Coll. Lab
<i>Escherichia coli</i>	0	++	++	Coll. Lab
<i>Escherichia coli</i> K12	++	++	++	Coll. Lab
<i>Hafnia alvei</i>	+++	0	+	Coll. Lab
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	++	++	Coll. Lab
<i>Proteus mirabilis</i>	+	0	0	Coll. Lab
<i>Proteus morgani</i>	0	0	0	Coll. Lab
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	Coll. Lab
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	Coll. Lab
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> hôpital BM0207	0	+++	++	CHU, Nantes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> hôpital colistine résistant BM0215	0	0	0	CHU, Nantes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> hôpital colistine résistant BM0217	0	0	+++	CHU, Nantes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	++	+++	+++	CNRS, Paris
<i>Pseudomonas stutzeri</i> BM0043	+++	++	+++	Coll. Lab
<i>Salmonella anatum</i>	++	++	++	Coll. Lab
<i>Salmonella enteritidis</i>	+++	++	+++	Coll. Lab
<i>Salmonella enteritidis</i> CIP7052	+	++	ND	Coll. Lab
<i>Serratia marcescens</i> BM0009	0	0	0	Coll. Lab
<i>Serratia marcescens</i> CIP6755	+	0	0	Coll. Lab
<i>Shigella flexneri</i>	++	++	+++	Coll. Lab
<i>Shigella sonnei</i>	++	++	+++	Coll. Lab
Levures				
<i>Candida albicans</i>	++	0	0	Coll. Lab
<i>Issatchenkia orientalis</i> DSM6128	++	0	++	Coll. Lab
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	0	0	Coll. Lab
Champignons				
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	0	ND	Coll. Lab
<i>Fusarium solanii</i>	+++	0	ND	Coll. Lab

La révélation des activités antimicrobiennes a été effectuée par tests simples couches. « 0 », absence d'inhibition ; « + », diamètre d'inhibition < 0,5 cm ; « ++ », 0,5 cm < diamètre d'inhibition < 1,5 cm ; « +++ », diamètre d'inhibition > 1,5 cm. ND : non déterminé. Coll. Lab : collection du laboratoire.

Les travaux menés sur ces deux *Paenibacillus* ont été poursuivis lors de cette thèse et seront présentés dans une première grande partie de ce chapitre de résultats et discussion. Cependant ces résultats concernent pour la plupart la souche B-LR puisque par souci de temps et par intérêt scientifique nous avons concentré nos efforts sur ce micro-organisme.

- Nous présenterons donc, tout d’abord les résultats obtenus lors de la caractérisation des molécules antibiotiques de B-LR par spectrométrie de masse haute résolution. Cette étape a permis de confirmer que cette souche produisait des peptides non-ribosomiques dont la colistine.
- Dans un deuxième temps nous décrirons les travaux destinés à caractériser les systèmes génétiques à l’origine de la production des peptides non-ribosomiques des souches B-LR et 32. Ainsi, des banques d’ADN génomiques ont été construites et criblées. Au terme de ce travail, un cluster de gènes, codant pour des synthétases non-ribosomiques nouvelles a été séquencé chez la bactérie B-LR (demande de brevet en cours).

Cette partie se terminera par la description des manipulations effectuées dans le but de démontrer le rôle de ce cluster dans la production des peptides non-ribosomiques produits par B-LR.

Les connaissances et les compétences développées dans le domaine des NRPS, ont été valorisées lors d’un travail mené sur des micro-organismes issus d’une station d’étude environnementale du laboratoire. Nous avons ainsi cherché, via un criblage par PCR dégénérées, des nouvelles séquences de NRPS dans une banque de micro-organismes issus de la vasière intertidale de Brouage (Charente Maritime). Cette niche écologique particulière présente la particularité d’évoluer au rythme des marées et fait cohabiter de nombreux micro-organismes au sein de biofilms complexes. Ces travaux ont fait l’objet d’une publication (Tambadou *et al.*, 2014). Ils seront présentés dans la dernière partie des résultats et discussion.

A. Caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution des molécules antibiotiques produites par la souche B-LR (UPLC-MS/MS)

Lors de travaux préliminaires nous avons pu vérifier que le *Paenibacillus* B-LR produit ses composés antibiotiques en milieu minimum M63T. Cette propriété est rare chez les *Paenibacillus* qui sont généralement des micro-organismes exigeants (croissance en milieux riches). Cette propriété est intéressante car elle facilite la purification et pourrait permettre d'obtenir industriellement des composés antibiotiques présentant un degré de pureté supérieur. Dans cette partie sera présenté le travail qui a permis de caractériser finement les composés produits par B-LR.

I PRODUCTION ET EXTRACTION DES MOLÉCULES

Afin de caractériser finement les molécules antibiotiques produites pas B-LR, un protocole simple de production et d'extraction a été mis au point (Figure 38). Dans ce protocole quatre fractions ont été collectées après Extraction sur Phase Solide (SPE) utilisant des colonnes de type Oasis HLB (Waters). L'optimisation de la méthode d'extraction a été d'abord effectuée en utilisant un témoin de colistine sulfate commerciale à une concentration de 2 mg/L, préparée dans du milieu de culture M63T. En effet, le spectre d'activité antimicrobienne de la souche B-LR étant proche de celui de la colistine, nous avons émis l'hypothèse que les composés antibiotiques produits par cette souche pouvaient avoir une structure proche de la colistine. Nous avons donc utilisé cette dernière pour déterminer les bonnes conditions d'extraction en SPE.

Les analyses en Chromatographie Liquide Ultra Performante (UPLC) de la colistine ont été effectuées avec les fractions F₃ et F₄. Les deux pics correspondant aux colistines E₁ et E₂ ont été retrouvés dans la fraction F₄. Par conséquent, il a été décidé d'utiliser cette fraction F₄ pour la suite des analyses.

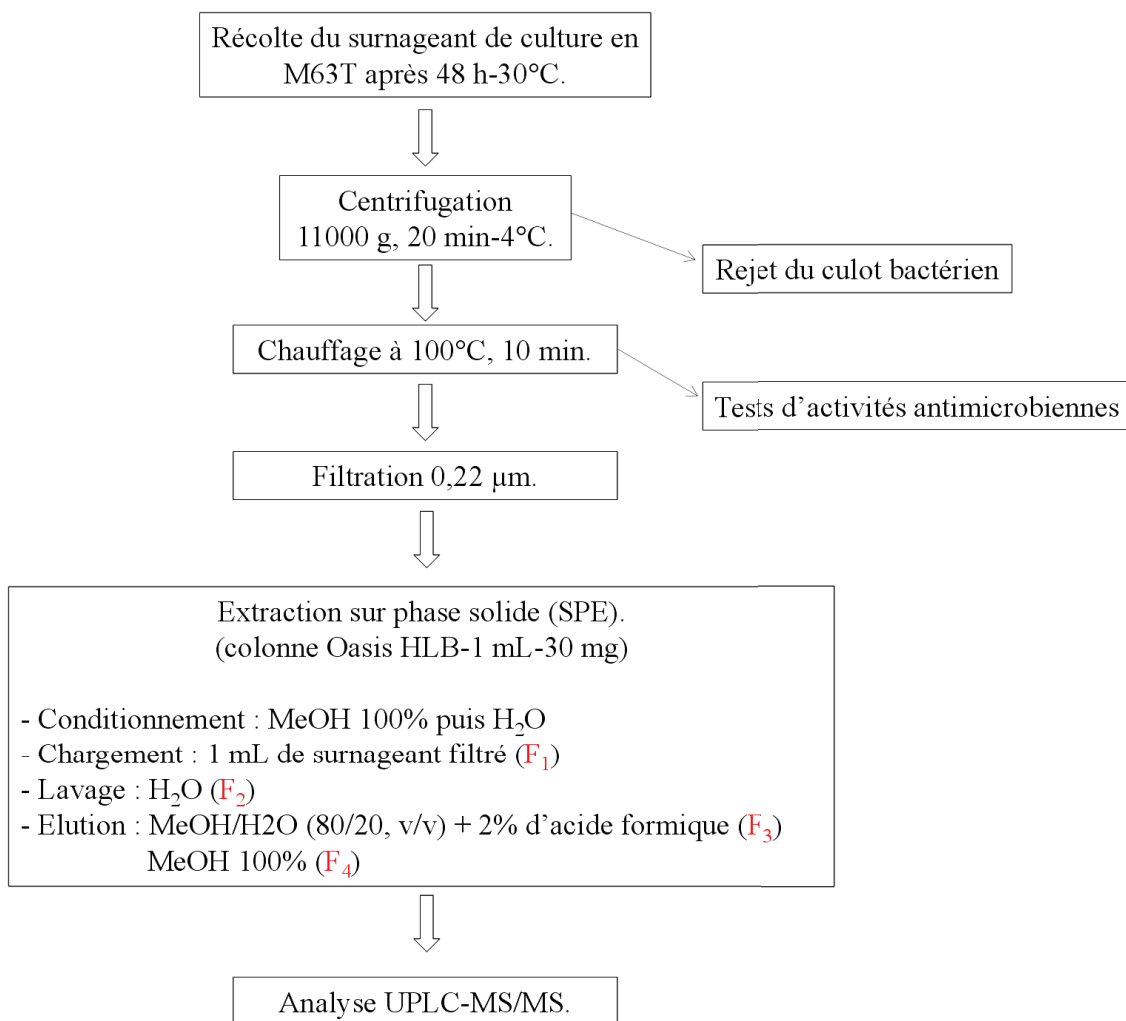


Figure 38 : Protocole de production et d'extraction des molécules du surnageant de culture de la souche B-LR avant analyse en UPLC.

F₁, F₂, F₃ et F₄ représentent les fractions collectées. MeOH : méthanol. Les analyses en UPLC ont été effectuées avec les fractions F₃ et F₄.

II SÉPARATION DES COMPOSÉS PAR UPLC-MS

Les peptides contenus dans la fraction F₄ obtenue à partir du surnageant de culture de B-LR, ont été analysés et séparés par chromatographie liquide ultra performante couplée à un spectromètre de masse Xevo G2-S QTOF (UPLC/MS) comme décrit dans le paragraphe .III.3 p. 99 du matériel et méthodes. La phase mobile permettant la séparation des composés est un mélange eau (0,1% d'acide formique pour l'éluant A) et acétonitrile (0,1% d'acide formique pour l'éluant B). La séparation a été effectuée à 25°C avec un débit de 0,4 mL/min. Les composés séparés ont été ensuite directement détectés par spectrométrie de masse. Le processus d'ionisation par electrospray (ESI) en mode positif a été utilisé. Ce processus conduit

à la formation de plusieurs ions parents à partir de la molécule initiale. Le profil chromatographique obtenu pour l'analyse du surnageant de culture de la souche B-LR présente 17 pics d'élution correspondant chacun à un ion parent (donnée non montrée). L'ensemble des composés présents sur le chromatogramme de la fraction F4 a été résumé dans le Tableau 11.

Les composés majoritaires retrouvés dans la fraction F4 sont Be1, Be2, E1 et E2 avec des temps de rétention (Tr) respectifs de 2,37 ; 2,38 ; 1,51 et 1,52 min. Les masses moléculaires $[M+H]^+$ respectives des deux dernières molécules 1169,77 Da et 1155,76 Da correspondent à celles des colistines E₁ et E₂ décrites dans la littérature (Figure 21 p. 52).

Par la suite aux temps de rétention 1,67+1,76 et 1,50 nous avons pu retrouver des molécules présentant des masses moléculaires $[M+H]^+$ respectivement de 1183,75 Da et 1141,74 Da, équivalentes aussi à celle des colistines Ile-E₈ et Val-E₂ décrites dans la littérature. Ces premiers résultats étayent l'hypothèse selon laquelle, B-LR produit des molécules antibiotiques appartenant à la famille des polymyxines. Afin de confirmer ce travail et pour aller plus loin dans la caractérisation des autres molécules issues du surnageant, les ions parents ont été fragmentés.

Tableau 11 : Ions parents obtenus après analyse en UPLC-MS du surnageant de culture de la souche B-LR.

Nom	Tr (min)	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺	[M+4H] ⁴⁺	Formule Brute	AG+Dab (m/z)	Formule (AG+Dab)
Be1	2,37	1003,60	1025,57	502,30	-	-	C ₄₈ H ₇₉ N ₁₀ O ₁₃	229,1555	C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₃
Be2	2,38	1017,60	1039,60	509,30	-	-	C ₄₉ H ₈₁ N ₁₀ O ₁₃	229,1554	C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₃
E1	1,61	1169,77	1191,76	585,39	390,60	293,20	C ₅₃ H ₁₀₁ N ₁₆ O ₁₃	241,1928	C ₁₃ H ₂₅ N ₂ O ₂
E2	1,52	1155,76	1177,75	578,38	385,93	289,70	C ₅₂ H ₉₉ N ₁₆ O ₁₃	227,1753	C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₂
Ile-E8	1.67+1.76	1183,75	-	592,38	395,26	296,69	C ₅₃ H ₉₈ N ₁₆ O ₁₄	255,1718	C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₃
Inc1	2,11	989,57	1011,56	495,29	-	-	C ₄₇ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃	215,1396	C ₁₀ H ₁₉ N ₂ O ₃
Inc2	1.82+1.95	1197,76	-	599,39	399,93	300,20			
Inc3	2,14	1003,58	-	502,30	-	-	C ₄₈ H ₇₉ N ₁₀ O ₁₃	215,1393	C ₁₀ H ₁₉ N ₂ O ₃
Val-E2	1,50	1141,74	1163,73	571,38	-	-	C ₅₁ H ₉₇ N ₁₆ O ₁₃	227,1758	C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₂
Inc5	2,45	1031,57	1053,56	516,30	-	-	C ₄₉ H ₇₉ N ₁₀ O ₁₄	229,1550	C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₃
Inc6	2,45	1045,59	1067,57	523,30	-	-	C ₅₀ H ₈₁ N ₁₀ O ₁₄	229,1552	C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₃
Inc8	1,80	975,55	997,53	488,98	-	-	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃	215,1396	C ₁₀ H ₁₉ N ₂ O ₃
Inc10	2,45	1253,75		627,38					
Inc11	2,42	1239,74	-	620,38	-	-	C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₃	255,1712	C ₅₅ H ₉₉ N ₁₆ O ₁₆
Inc12	2,24	1211,75	-	606,38	-	-	C ₅₄ H ₉₉ N ₁₆ O ₁₅	255,1714	C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₃
Inc14	1,87	904,51	926,49	452,76	-	-	C ₄₃ H ₇₀ N ₉ O ₁₂	116,0712	C ₅ H ₁₀ NO ₂
Inc15	1,85	890,50	912,48	445,75	-	-	C ₄₂ H ₆₈ N ₉ O ₁₂	116,0711	C ₅ H ₁₀ NO ₂

AG seul

Conditions chromatographiques : Colonne C₁₈ Acquity UPLC BEH (2,1 x 50 mm ; 1,7 µm ; 130 Å), injection de 5 µL de surnageant contrôlé à 4°C, éluant A : eau (0,1% acide formique), éluant B : acétonitrile (0,1% acide formique). Séparation à 25°C. Débit de 0,4 mL/min. Tr = temps de rétention, AG = Acide gras et Dab = acide diaminobutyrique.

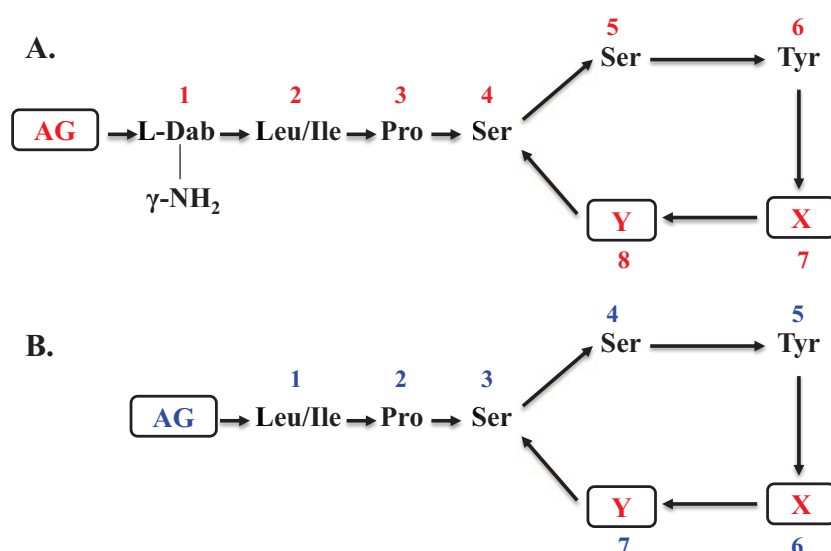
Conditions MS : Source d'ionisation par electrospray en mode positif. Mode d'acquisition en Full Scan et MS^E. Gamme de masse de 50 à 1500 m/z. La masse de 116,0711 et la formule C₅H₁₀NO₂ correspondent à l'AG tout seul sans acide diaminobutyrique.

III ANALYSE DES STRUCTURES

Afin d'élucider la structure des composés antibiotiques produits par B-LR, la MS/MS haute résolution a été utilisée pour fragmenter les ions parents. Lors de cette MS/MS, la leucine et l'isoleucine ne pouvaient pas être différenciées en raison de leur masse moléculaire identique. Les spectres de masse obtenus ont permis d'élucider la structure de 12 lipopeptides présentant une partie cyclique. Des homologues de structure ont pu être établies, et ces molécules ont pu être rassemblées dans 3 groupes différents. Ces lipopeptides se distinguent les uns des autres principalement par le nombre d'acides aminés intégrés dans leur partie cyclique. On distinguera donc les molécules contenant des cycles de 5 acides aminés (aa), de 6 aa et de 7 aa.

.III.1 Composés possédant une partie cyclique à 5 acides aminés

Sept molécules font partie de ce groupe. Ce sont des molécules à 7 aa (Inc14 et Inc15 ; Tableau 11 p. 111) et à 8 acides aminés (Be1, Be2, Inc1, Inc3 et Inc8 ; Tableau 11 p. 111). La structure de ces composés est présentée dans la Figure 39. Leurs poids moléculaires vont de 889,50 Da à 1116,60 Da. La comparaison des molécules à 8 aa (Figure 39A) montre des homologies au niveau des aa 1 à 6 (L-Dab₁-Leu/Ile₂-Pro₃-Ser₄-Ser₅-Tyr₆-) et des différences au niveau des aa 7 et 8 (X-Y) ainsi qu'au niveau de l'acide gras.



Nom	Acide Gras (AG)	X	Y	Masse (Da)	Formule brute	Structure
Be1	C ₇ H ₁₂ O ₂	Orn	Leu/Ile	1002,60	C ₄₈ H ₇₉ N ₁₀ O ₁₃	A.
Inc1	C ₆ H ₁₀ O ₂	Orn	Leu/Ile	988,57	C ₄₇ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃	
Be2	C ₇ H ₁₂ O ₂	Lys	Leu/Ile	1016,60	C ₄₉ H ₈₁ N ₁₀ O ₁₃	
Inc3	C ₆ H ₁₀ O ₂	Lys	Leu/Ile	1002,58	C ₄₈ H ₇₉ N ₁₀ O ₁₃	
Inc8	C ₆ H ₁₀ O ₂	Orn	Val	974,55	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃	
Inc14	C ₅ H ₁₀ NO ₂	Lys	Leu/Ile	903,51	C ₄₃ H ₇₀ N ₉ O ₁₂	B.
Inc15	C ₅ H ₁₀ NO ₂	Orn	Leu/Ile	889,50	C ₄₂ H ₆₈ N ₉ O ₁₂	

Figure 39 : Structures chimiques et masses des lipopeptides produits par B-LR possédant une partie cyclique à 5 acides aminés déterminées par MS/MS.

A = structures à 8 acides aminés. **B** = structures à 7 acides aminés.

AG = acide gras, L-Dab = acide L-2,4 Diaminobutyrique, Leu = Leucine, Ile = Isoleucine, Pro = Proline, Ser = Sérine, Tyr = Tyrosine, Orn = Ornithine et Val = Valine. Les molécules Inc14 et Inc15 ne possèdent pas de L-Dab en position 1 (Structure B.), elles débutent par une Leu/Ile en position 1 et ont 7 acides aminés.

Les molécules Be1 (1002,60 Da) et Inc1 (988,57 Da) ont les mêmes séquences en acides aminés avec une différence de masse moléculaire de 14 Da qui correspond à une perte d'un CH₂ au niveau de l'acide gras. Ce sont des molécules homologues.

Les molécules Be2 (1016,60 Da) et Inc3 (1002,58 Da) sont aussi des homologues. Elles ont les mêmes séquences en acides aminés avec une différence de masse moléculaire de 14 Da qui correspond à une perte d'un CH₂ au niveau de l'acide gras.

La comparaison des molécules Inc14 et Inc15 à 7 aa (Figure 39B) révèle des homologies au niveau de l'acide gras et des aa 1 à 5 (-Leu/Ile₁-Pro₂-Ser₃-Ser₄-Tyr₅-) et des différences au niveau des aa 6 et 7 (X-Y).

Parmi les molécules possédant un cycle à 5 aa, on retrouve les masses des molécules préalablement identifiées de façon préliminaire en LC-MS basse résolution qui correspondent à Be1 et Be2 (Figure 40). L'analyse en UPLC/MS a permis d'aller plus loin et d'identifier une sérine en position 5, une tyrosine en position 6, une ornithine ou une lysine en position 7 (pour le composé Be1 et Be2 respectivement), une leucine ou isoleucine en position 8 et une sérine en position 4. Ces résultats viennent compléter ceux obtenus en basse résolution et affiner la structure complète de ces deux molécules au niveau de leur partie cyclique (Figure 40).

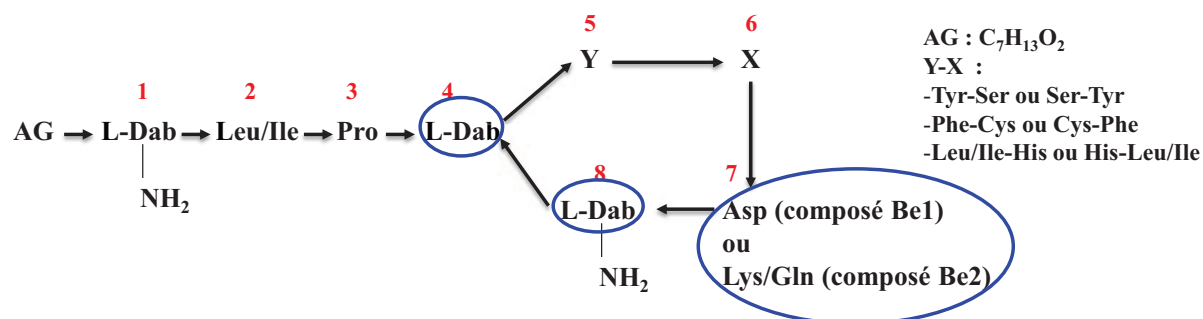
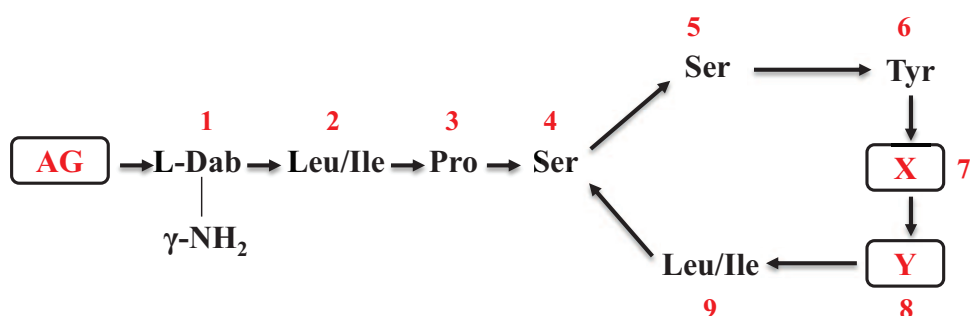


Figure 40 : Structures des composés antibiotiques produits par B-LR identifiés par spectrométrie de masse basse résolution.

AG = Acide Gras, L-Dab = acide L-2,4 Diaminobutyrique, Leu = Leucine, Ile = Isoleucine, Pro = Proline, Asp = Acide aspartique, Lys = Lysine, Gln = Glutamine, Tyr = Tyrosine, Ser = Sérine, Phe = Phénylalanine, Cys = Cystéine et His = Histidine.

.III.2 Composés possédant une partie cyclique à 6 acides aminés

Deux molécules entrent dans cette catégorie (Inc5 et Inc6) (Figure 41). Elles comportent 9 acides aminés avec un cycle à 6 aa. Leurs poids moléculaires vont de 1030,57 Da à 1044,59 Da. La comparaison de ces deux molécules montre des homologues au niveau des aa 1 à 6 et 9 (L-Dab₁-Leu/Ile₂-Pro₃-Ser₄-Ser₅-Tyr₆-) et des différences au niveau des aa 7 et 8 (X-Y) ainsi qu'au niveau de l'acide gras.



Nom	Acide Gras (AG)	X	Y	Masse (Da)	Formule brute
Inc5	C ₇ H ₁₃ O ₂	Ala	Ala	1030,57	C ₄₉ H ₇₉ N ₁₀ O ₁₄
Inc6	C ₆ H ₁₀ O ₂	Gly Val	Val Gly	1044,59	C ₅₀ H ₈₁ N ₁₀ O ₁₄

Figure 41 : Structures chimiques et masses des lipopeptides produits par B-LR possédant une partie cyclique à 6 acides aminés déterminées par MS/MS.

AG = acide gras, L-Dab = acide L-2,4 Diaminobutyrique, Leu = Leucine, Ile = Isoleucine, Pro = Proline, Ser = Sérine, Tyr = Tyrosine, Ala = Alanine, Gly = Glycine et Val = Valine.

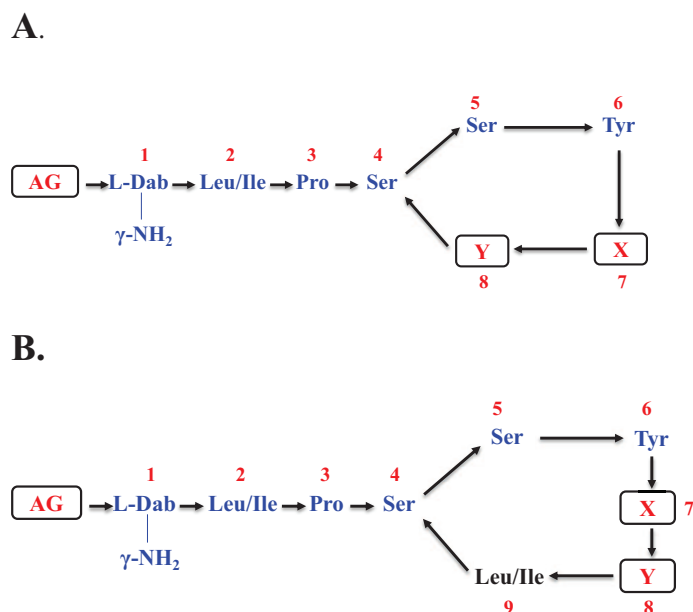


Figure 42 : Comparaison des structures possédant un cycle à cinq acides aminés (A.) et un cycle à six acides aminés (B.)

La comparaison des molécules comportant des cycles à 5 et 6 acides aminés (Figure 42) révèle leur ressemblance : d'une part elles ont en commun les aa 1 à 6 (L-Dab₁-Leu/Ile₂-Pro₃-Ser₄-Ser₅-Tyr₆-) et d'autre part elles possèdent un résidu Leucine/Isoleucine (en position 8 Figure 42A ou en position 9 Figure 42B) qui permet leur cyclisation à l'exception du composé Inc8 qui possèderait une valine à la place (Figure 39).

La structure de ces molécules montre qu'elles sont peu cationiques. Elles comporteraient une seule charge positive portée par l'acide diaminobutyrique en position 1 (Figure 42). Étant donné que les molécules Be1 et Be2 (octapeptides) sont majoritairement produites par B-LR, une comparaison de ces molécules avec des antibiotiques connus produites par les *Paenibacillus* a été effectuée. La structure de ces molécules ressemble aux octapéptines qui possèdent aussi un résidu L-Leucine en position 8 permettant la cyclisation de ces molécules (Terabe *et al.*, 1979 ; Cochrane & Vederas, 2014). Cependant les acides aminés ne sont pas les mêmes car les octapéptines seraient des polymyxines tronquées avec un cycle à 7 résidus (Cochrane & Vederas, 2014). À notre connaissance, cette famille de molécule n'a jamais encore été décrite dans la littérature. Nous n'avons pas pu trouver de molécule équivalente dans la base de données NORINE. En outre nous n'avons pas trouvé d'exemple d'autres molécules cyclisées sur une serine et présentant une chaîne latérale. Le rôle biologique de ces molécules demeure donc inconnu.

.III.3 Composés possédant une partie cyclique à 7 acides aminés

Trois molécules entrent dans ce groupe. Il s'agit de décapeptides avec un cycle à sept aa (Figure 43). Leurs poids moléculaires vont de 1140,74 Da à 1168,77 Da. La comparaison de ces molécules montre des homologues au niveau des aa 1 à 6 et 8 à 10 et des différences au niveau de l'aa 7 ainsi qu'au niveau de l'acide gras. Ces 3 molécules correspondent aux colistines E₁ et E₂ et à la Val-colistine E₂ (Figure 43).

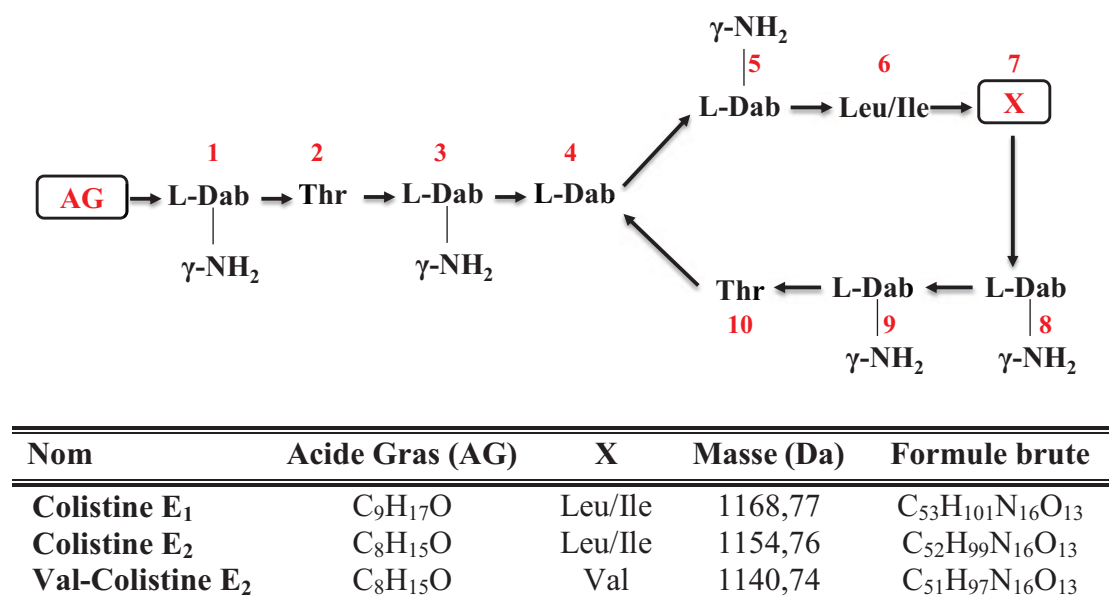


Figure 43 : Structures chimiques et masses des lipopeptides produits par B-LR possédant une partie cyclique à 7 acides aminés déterminées par MS/MS.

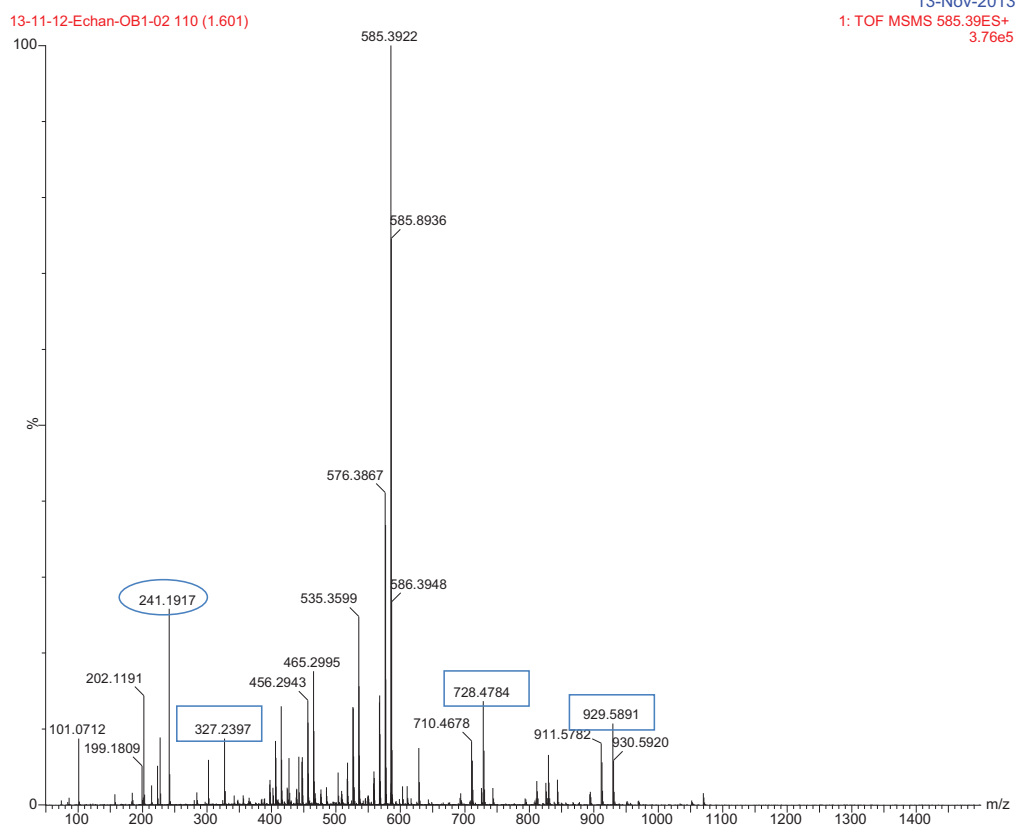
AG = acide gras, L-Dab = acide L-2,4 Diaminobutyrique, Thr = Thréonine, Leu = Leucine, Ile = Isoleucine et Val = Valine.

Les spectres de masse obtenus pour les colistines E₁, E₂ et Val-colistine E₂ présentent des valeurs de $[M+2H]^{2+}$ respectives de 585,39 ; 578,38 et de 571,38 (Figure 44 p. 119, Figure 45 p. 120 et Figure 46 p. 121). La fragmentation des ions parents des colistines E₁ et E₂ donne des ions fils de m/z 829, 728, 628, 427, 327 et 227 (Figure 44 p. 119 et Figure 45 p. 120) qui sont formés par perte de fragments d'aa. La fragmentation de l'ion parent de la Val-colistine E₂ donne des ions fils de m/z 815, 714, 614, 514, 413, 313 et 213 (Figure 46 p. 121) formés aussi par perte de fragments d'aa.

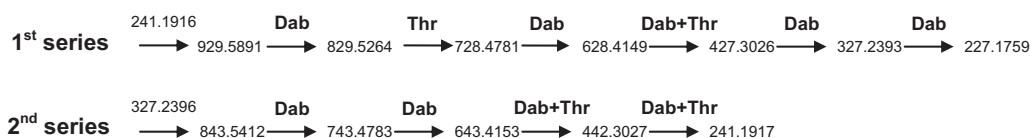
Ces ions fils obtenus sont identiques à ceux décrits dans la littérature lors de la fragmentation des colistines E₁, E₂ et Val-E₂ (Govaerts *et al.*, 2002 ; DeCrescenzo *et al.*, 2007). Les colistines E₁ et E₂ ont les mêmes séquences d'acides aminés avec une différence de masse moléculaire de 14 Da qui correspond à une perte d'un CH₂ au niveau de l'acide gras.

En conclusion, la souche B-LR produit de la colistine E₁, de la colistine E₂ et de la valine colistine E₂ (Val-E₂). Ces molécules sont des décapeptides cationiques et cycliques avec 5 charges positives portées par les acides diaminobutyriques à pH physiologique.

A.



$[M+2H]^{2+}$: 585.3922



B.

E1

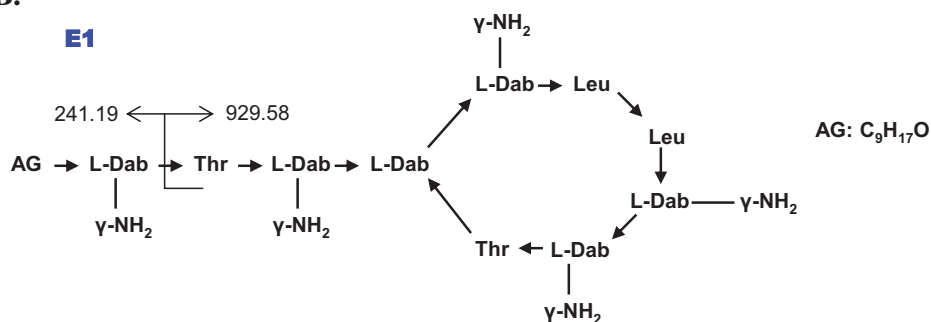


Figure 44 : (A) Spectre MS/MS correspondant à la fragmentation de l'ion précurseur dichargé (m/z 585,39). (B) Structure proposée pour le peptide correspondant colistine E₁.

AG : acide gras (C₉H₁₇O) ; L-Dab : acide L-2,4 diaminobutyrique ; Thr : Thréonine ; Leu : Leucine. Les carrés et les ronds correspondent aux ions produits en première et seconde séries.

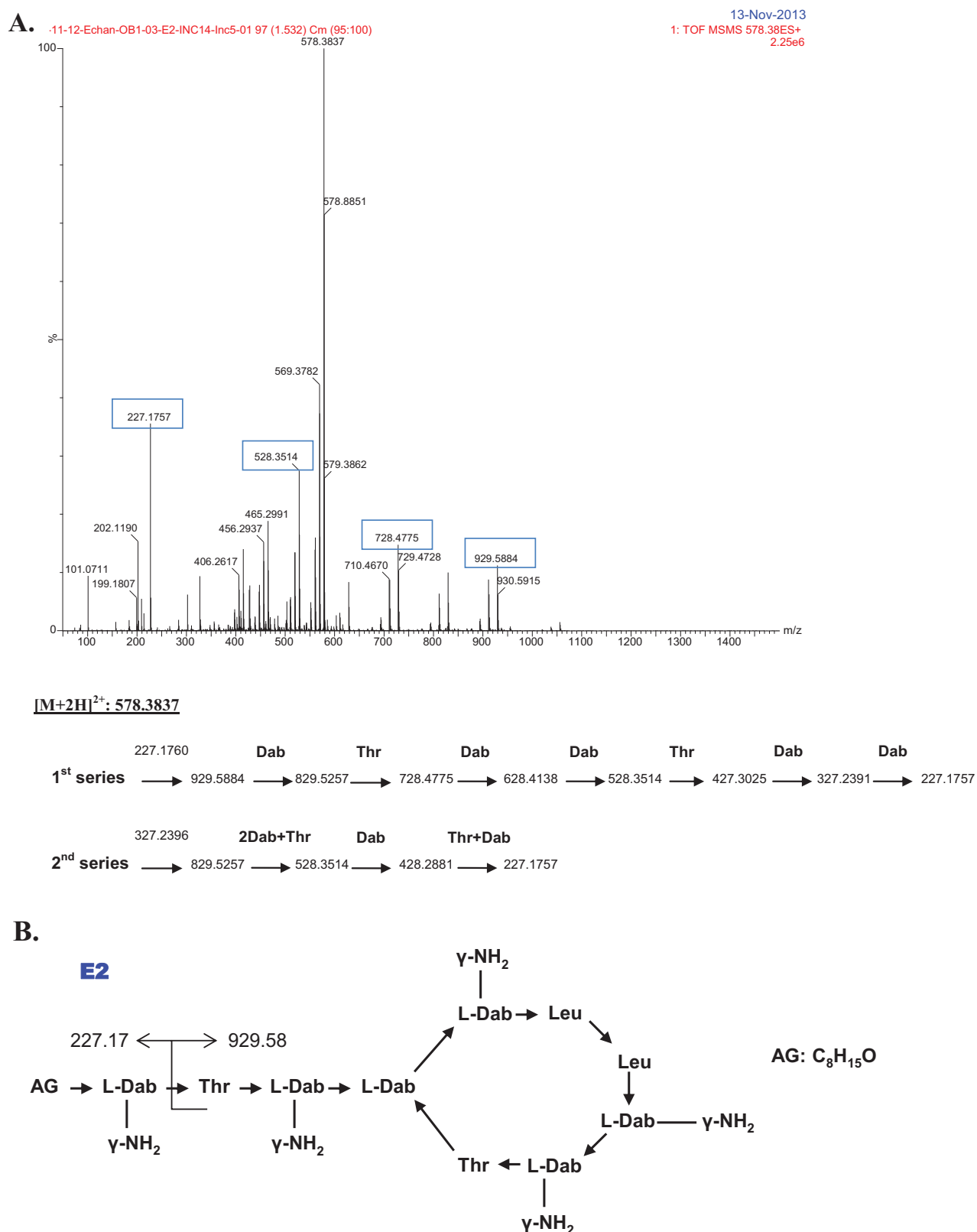


Figure 45 : (A) Spectre MS/MS correspondant à la fragmentation de l'ion précurseur dichargé (m/z 578,38). (B) Structure proposée pour le peptide correspondant colistine E₂.

AG : acide gras ($C_8H_{15}O$) ; L-Dab : acide L-2,4 diaminobutyrique ; Thr : Thréonine ; Leu : Leucine. Les carrés correspondent aux ions produits en première série.

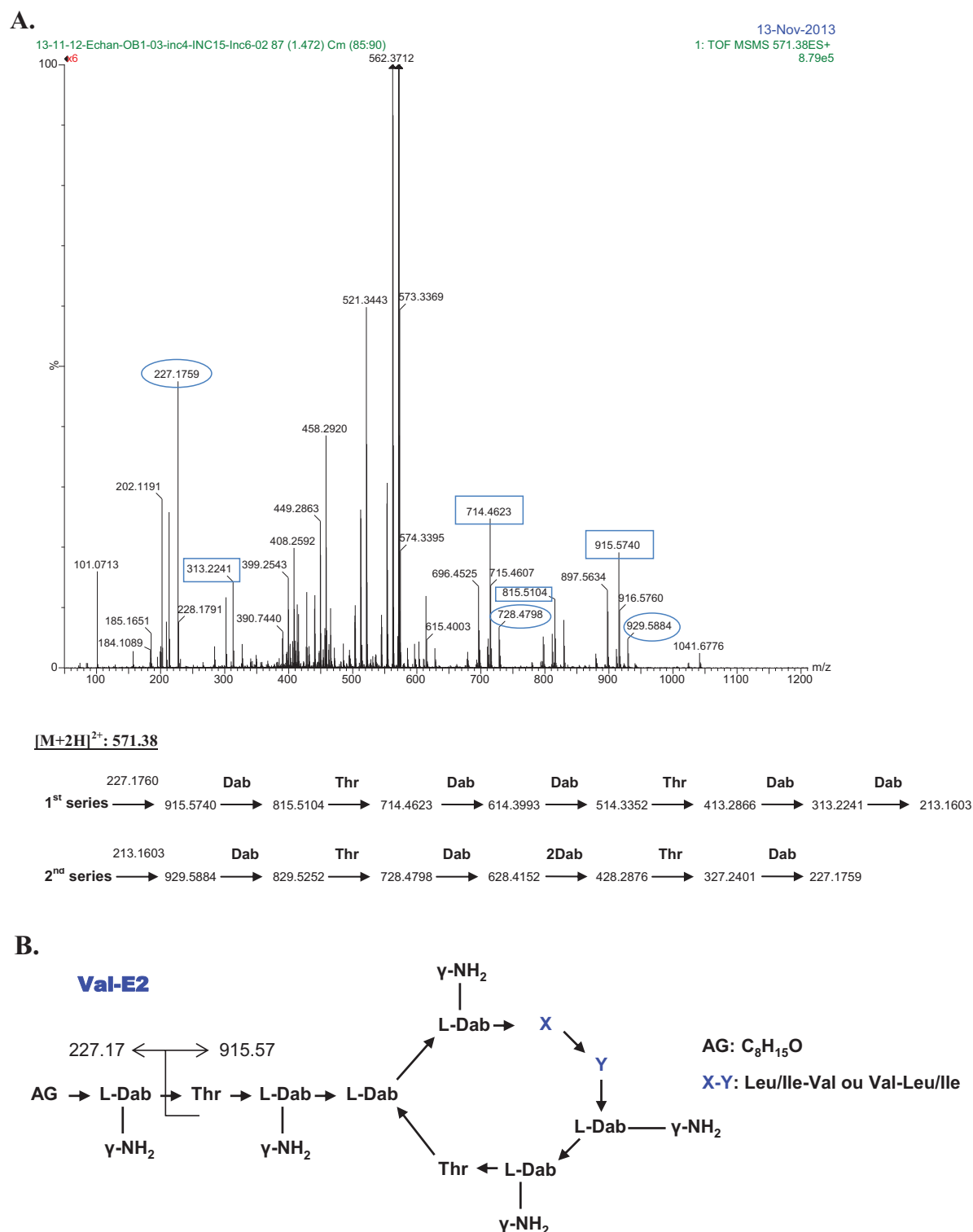


Figure 46 : (A) Spectre MS/MS correspondant à la fragmentation de l'ion précurseur dichargé (m/z 571,38). (B) Structure proposée pour le peptide correspondant Val-E₂.

AG : acide gras ($C_8H_{15}O$) ; L-Dab : acide L-2,4 diaminobutyrique ; Thr : Thréonine ; Ile : Isoleucine ; Leu : Leucine ; Val : Valine. Les carrés et les ronds correspondent aux ions produits en première et seconde séries.

B. Étude des systèmes NRPS des *Paenibacillus*

B-LR et 32

Les travaux décrits dans la partie précédente ont permis de caractériser certains peptides produits par la souche B-LR. Parmi ces molécules nous avons détecté des colistines qui appartiennent à la famille des polymyxines.

Li & Jensen (2007, Canada) et Park & Choi (2007, 2009, Brevet République de Corée) ont pu démontrer que les polymyxines A et B ainsi que les fusaricidines étaient produites par des NRPS.

Nous avons donc cherché à vérifier l'hypothèse selon laquelle les souches B-LR (productrice de colistine) et 32 (productrice de depsipeptides proches des fusaricidines) utilisaient également des systèmes NRPS pour ces productions.

IV CONSTRUCTION DE BANQUES D'ADN GÉNOMIQUES

Afin d'identifier les clusters de gènes responsables de la production des molécules antibiotiques chez les bactéries B-LR et 32, deux banques d'ADN génomiques ont été construites. Le choix des vecteurs de clonage utilisés pour la construction de ces banques repose essentiellement sur la taille des inserts à intégrer. En effet, les clusters impliqués dans la biosynthèse des fusaricidines et des polymyxines chez les *P. polymyxa* sont de tailles importantes (entre 33 et 40 kb respectivement). Le vecteur choisi doit donc permettre d'intégrer des inserts de cette taille. Les fosmides et les cosmides ont été utilisés pour l'étude de tels clusters. Cependant, lors d'une étude sur le cluster de production de la fusaricidine chez *P. polymyxa* PKB1, un problème de stabilité des inserts a été observé avec une banque cosmique. Cette instabilité résulterait de réarrangements entre les inserts et l'ADN génomique (Li *et al.*, 2007). Pour éviter ces instabilités, nous avons choisi les fosmides pour la construction des banques. Les fosmides permettent d'intégrer des inserts de tailles allant de 35 à 45 kb et possèdent les éléments cos des phages lambda (Kim *et al.*, 1992). Ces derniers permettent l'encapsulation des éléments génétiques au sein de phages, qui seront utilisés pour la transformation des cellules hôtes. Ils sont présents en faible nombre de copies dans les cellules et par conséquent ils sont plus stables que les cosmides.

La mise au point de cette nouvelle méthodologie a été particulièrement difficile en raison de la longueur des fragments à cloner. Plusieurs tentatives de construction se sont avérées infructueuses. Une longue période de mise au point a donc été nécessaire.

▪ **Test de l'efficacité des phages λ utilisés pour l'encapsidation :**

Avant de procéder à la construction des banques il est impératif de vérifier l'efficacité des extraits de phages utilisés. La diminution de l'efficacité d'encapsidation entraîne une diminution considérable du nombre de clones attendus lors de l'infection.

Pour cela il faut suivre le protocole classique de construction d'une banque en utilisant un ADN « control » déjà ligaturé (Stratagene) et infecter les bactéries *E. coli* VCS257 ou *E. coli* LE392MP qui sont sensibles aux phages λ . Ce protocole permet d'obtenir des plages de lyses en lieu et place de colonies d'une banque normale. En comptant le nombre de plages de lyse obtenues on pourra calculer l'efficacité d'encapsidation en pfu/ μ g d'ADN (pfu, unité formant plaque). Cette étape ne sera validée que si l'efficacité obtenue est supérieur à 1.10^9 pfu/ μ g.

▪ **Détermination du nombre de clones représentatifs d'une banque :**

Une banque génomique est complète que si elle est représentative de l'ensemble du génome des souches étudiées. La probabilité d'avoir une séquence quelconque d'ADN dans la banque peut être calculée avec la formule suivante :

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$$

Où N est le nombre de clones recombinants nécessaires, P la probabilité de couvrir le génome, F le rapport entre la taille moyenne des inserts et la taille du génome de la souche utilisée. En se basant sur la taille des génomes des souches de *P. polymyxa* (~ 6000 kb) et une taille moyenne des inserts de 40 kb, le nombre de clones nécessaires pour obtenir des banques représentatives des génomes des souches B-LR et 32 avec une probabilité de 99% est d'environ 689.

.IV.1 Clonage dans pSMART-FOS : banque de la souche 32

La banque fosmidique du *Paenibacillus* 32 a été construite en fragmentant l'ADN génomique de façon mécanique avec une pipette de 200 μ L. Les coupures mécaniques ont été réalisées par cycle de 200 pipetages-refoulements. L'ADN fragmenté est ligaturé dans le vecteur fosmidique

pSMART-FOS et le mélange de ligation a été encapsidé dans les extraits de phages Gigapack III XL, formant ainsi des phages recombinants. Pour être sûr d'avoir au moins les 689 colonies de la banque, il est nécessaire de faire un titrage des particules de phages en étalant sur boîte une première fois un mélange de 10 µL de bactériophages et de 100 µL d'*E. coli* Replicator FOS préparées. Pour les 10 µL de phages recombinants étalés 25 colonies ont été obtenues, donc il faut étaler au minimum 240 µL de phages recombinants pour avoir environ 600 colonies.

Après un étalement de 300 µL de phages recombinants, environ 1300 colonies ont été obtenues. Au final la banque d'ADN génomique de la souche 32 est constituée de 1300 clones. La banque a ensuite été repiquée sur boîtes YT-CXIS de façon à individualiser les 1300 clones d'*E. coli*. Ceux-ci sont alors conservés dans des plaques de microtitration de 96 puits.

.IV.2 Clonage dans pEpiFOS™ : banque de la souche B-LR

Le fosmide pEpiFOS™ a été utilisé pour la construction de la banque génomique du *Paenibacillus* B-LR après plusieurs tentatives infructueuses de construction dans le fosmide pSMART-FOS. L'ADN génomique de la souche B-LR a été digéré partiellement avec l'enzyme de restriction *Bam*HI (5'-GGATCC-3') dont la fréquence de coupure est de 1/4096. La taille des fragments de restriction retenue pour la ligation est de 35 à 45 kb. Les fragments obtenus ont été ligaturés dans le fosmide pEpiFOS™ préalablement digéré par *Bam*HI et déphosphorylé. Le site *Bam*HI est présent dans le gène *lacZ*. Le mélange de ligation obtenu a ensuite été encapsidé dans les extraits de phages MaxPlax λ, formant des phages recombinants. Pour déterminer le titre de la banque, 10 à 50 µL de produit d'encapsidation ont été utilisés pour infecter 100 µL d'une culture d'*E. coli* EPI100-T1R. Pour les 10 µL de phages étalés, 20 colonies ont été obtenues, et pour les 50 µL de phages 100 à 150 colonies ont été obtenues.

La totalité des phages a été utilisée pour infecter les cellules d'*E. coli* EPI100-T1R, ce qui a permis d'obtenir une banque d'ADN génomique de 960 clones d'*E. coli* contenant chacun un petit fragment d'ADN de la bactérie B-LR. La banque est ensuite repiquée sur boîtes LB-chloramphénicol de façon à individualiser les 960 clones dans des plaques de microtitration de 96 puits.

V CRIBLAGE DE LA BANQUE B-LR

Par manque de temps la banque de la bactérie 32 n'a pas pu être criblée. Seule celle du *Paenibacillus* B-LR a subi une étude poussée.

L'objectif du criblage était de retrouver dans ces 960 clones le ou les gènes impliqués dans la biosynthèse des molécules antibiotiques produites par le *Paenibacillus* B-LR. Cette souche produit majoritairement deux types de peptides d'intérêts : des colistines (polymyxine E) et des composés à 8 acides aminés. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les gènes de productions recherchés partageaient des homologies avec les gènes responsables de la synthèse des polymyxines décrits dans la littérature (Choi *et al.*, 2009 ; Shaheen *et al.*, 2011). Ainsi, pour retrouver ces séquences homologues, des techniques de criblage par PCR dégénérées et non dégénérées sur colonies ont été mises en place.

.V.1 Mises au point des amorces

Différentes amorces dégénérées permettant d'amplifier les régions conservées de certains domaines d'adénylation intégrant des acides aminés communs aux polymyxines et aux peptides d'intérêts produits par la souche B-LR (Figure 47) ont donc été conçues. Ces amorces sont ensuite utilisées pour rechercher des clones d'intérêts dans la banque.

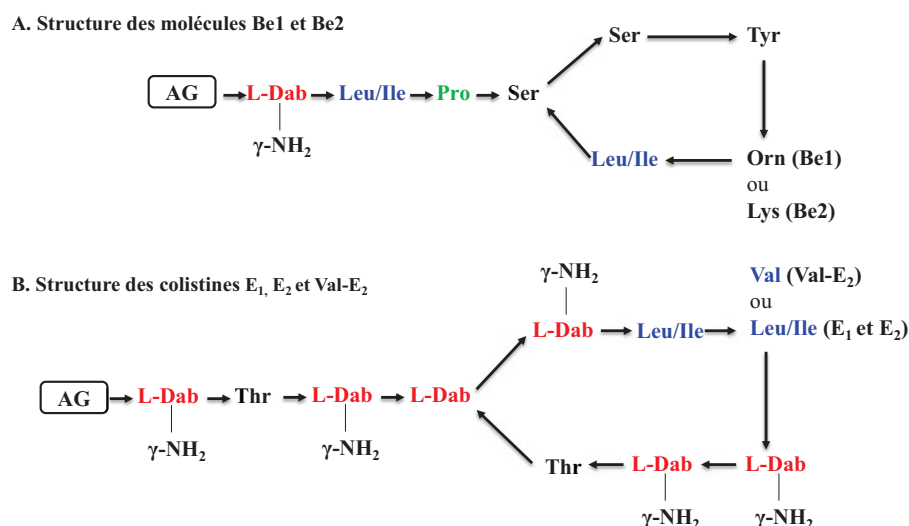


Figure 47 : Structures des peptides antibiotiques d'intérêts majoritairement produits par le *Paenibacillus* B-LR identifiées par spectrométrie de masse.

AG = Acide Gras, L-Dab = acide L-2,4 Diaminobutyrique, Leu = Leucine, Ile = Isoleucine, Pro = Proline, Ser = Sérine, Tyr = Tyrosine, Orn = Ornithine, Lys = Lysine, Thr = Thréonine.

Exemples des amorces « L-2,4-diaminobutyrique » (LDAB-F/LDAB-R)

L'acide L-2,4-diaminobutyrique (L-Dab) est le monomère le plus représenté dans la structure des colistines (Figure 21 p. 52). Les domaines A responsables de son incorporation représentent donc une bonne cible pour la recherche du cluster d'intérêt.

Des alignements ont donc été effectués avec les séquences nucléiques des domaines d'adénylation des modules 1, 3, 4, 5, 8 et 9 des synthétases PmxE et PmxA décrites comme étant responsables de l'incorporation de l'acide L-2,4-diaminobutyrique (Choi *et al.*, 2009 ; Shaheen *et al.*, 2011). Ces alignements ont révélé des motifs conservés qui ont permis de définir des amorces dégénérées spécifiques de ces domaines. La Figure 48 montre l'alignement des 6 domaines d'adénylation et les motifs conservés qui ont abouti à l'obtention du couple d'amorces dégénéré LDAB-F/LDAB-R.

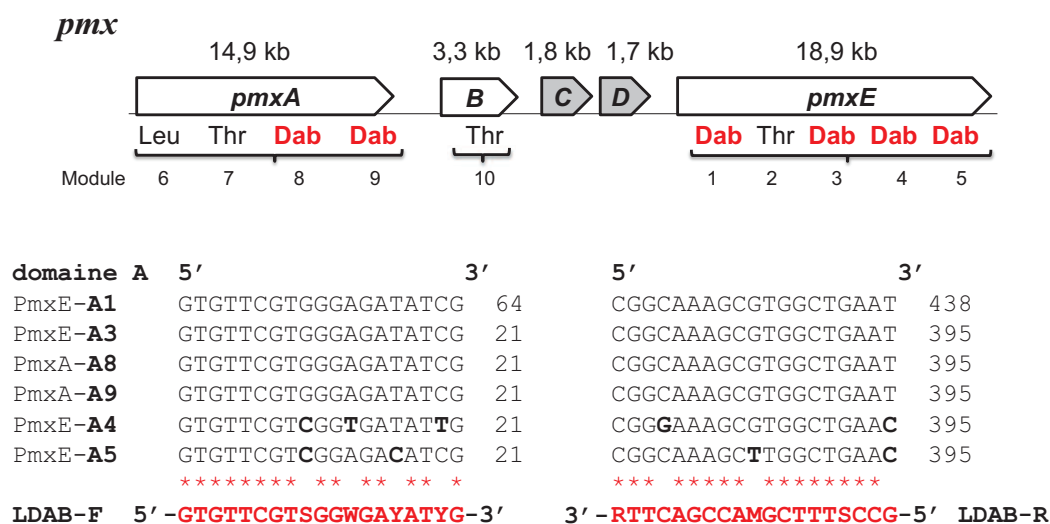


Figure 48 : Alignement des domaines d'adénylation conservés impliqués dans l'incorporation de l'acide diaminobutyrique (L-Dab) à partir des séquences NRPS du cluster de production de la polymyxine A (*pmx*) chez *P. polymyxa* E681 (Choi *et al.*, 2009).

Leu = Leucine, Thr = Thréonine et Dab = acide L-2,4 Diaminobutyrique. Les gènes *pmxA*, *B* et *E* codent pour des synthétases, *C* et *D* codent pour des transporteurs.

Ces amorces ont été utilisées pour révéler la présence des domaines d'adénylation incorporant des Dab chez la souche B-LR (ADN extrait et colonies) et chez la souche de référence productrice de polymyxine PKB1 (Beatty & Jensen, 2002). L'ADN des souches *E. coli* Réplicator FOS et *E. coli* EPI100-T1R ont servi de témoins négatifs (Figure 49). Les

extractions d'ADN ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe .II.1.1 p. 79 du matériel et méthodes.

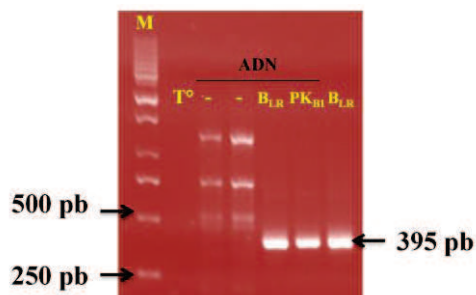


Figure 49 : Gel d'agarose des témoins positifs et négatifs permettant de valider les amorces LDAB (395 pb).

Puits M le marqueur de taille 1kb DNA Ladder ; Puits T° le témoin sans ADN ; Puits (-) les témoins négatifs contenant l'ADN des souches *E. coli* Réplicator FOS et *E. coli* EPI100-T1R ; Puits B_{LR} et PK_{B1} les témoins positifs contenant l'ADN des souches B-LR et PKB1.

Pour les amorces L-Dab la taille des fragments attendue était de 395 pb. Une bande de cette taille a été obtenue après amplification de l'ADN/colonies des témoins positifs (Figure 49). Cette étape a permis de valider ces amorces avant criblage de la banque.

Les 960 clones de la banque d'ADN génomique de B-LR répartis dans 10 boîtes de 96 puits ont été repiqués sur des boîtes de milieu LB gélosé. Dans un premier temps les clones de la banque ont été criblés par PCR dégénérée sur colonies avec les amorces L-Dab spécifiques des domaines d'adénylation incorporant l'acide L-2,4-diaminobutyrique. À l'issue de cette première sélection, 28/960 clones ont montré la présence d'un fragment de 395 pb (comme exemple la Figure 50A). Ces 28 clones présélectionnés constituent un pool positif. Ils ont ensuite été regroupés sur boîtes puis re-criblés par PCR sur colonies avec les mêmes amorces L-Dab pour valider cette étape de sélection (Figure 50B). Une fois validée, ces clones ont été ensuite testés tour à tour avec d'autres amorces.

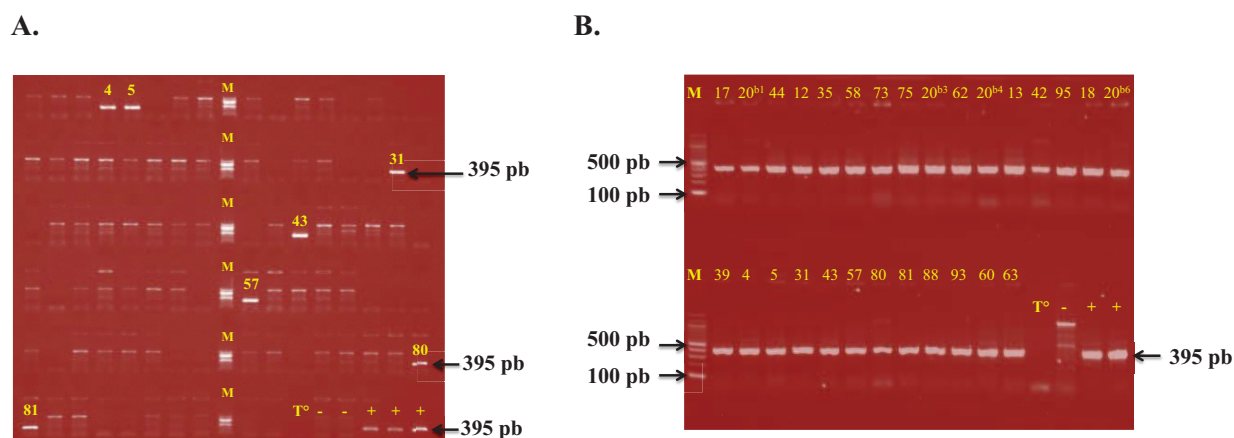


Figure 50 : Détection sur gel d'agarose des fragments amplifiés par PCR sur colonies des clones de la banque B-LR avec les amorces LDAB-F et LDAB-R (395 pb).

A. Puits 4, 5, 31, 43, 57, 80 et 81 indiquent le numéro des clones positifs ; Puits T° le témoin sans ADN ; Puits (-) les témoins négatifs contenant l'ADN des souches *E. coli* Réplicator FOS et *E. coli* EPI100-T1R ; Puits (+) les témoins positifs contenant l'ADN des souches B-LR et PKB1 ; Puits M le marqueur de taille 100 pb DNA Ladder. (Gel agarose 1,5% ; TBE 1X ; 40 min à 75 V).

B. Gel de vérification des 28 clones positifs après amplification avec les amorces LDAB-F et LDAB-R. (Gel agarose 1,5% ; TBE 1X ; 2 h à 100 V).

Pour affiner ce crible nous avons ensuite recherché par PCR les régions conservées des domaines d'adénylation permettant d'intégrer la leucine, la proline et l'isoleucine supposés présents dans la structure des composés antibiotiques produits par B-LR (Figure 47 p. 126). La proline et l'isoleucine ne sont pas présents dans les clusters de gènes de polymyxines séquencés dans la littérature, elles sont alors recherchées dans d'autres clusters.

▪ Amorces Leu1Pa-F/Leu1Pa-R

Une autre tentative de criblage a été effectuée avec des amorces spécifiques des domaines d'adénylation intégrant la leucine dans les deux synthétases PmxA des clusters *pmx* de production de la polymyxine A (*P. polymyxa* E681) et de la polymyxine B (*P. polymyxa* PKB1) (Choi *et al.*, 2009 ; Shaheen *et al.*, 2011). La Figure 51 montre l'alignement de ces 2 domaines d'adénylation et les motifs conservés qui ont permis d'obtenir le couple d'amorces Leu1Pa-F/Leu1Pa-R. Ce couple d'amorces permet d'amplifier des fragments spécifiques de 350 pb.

domaine A	5'	3'	5'	3'
PmxA-A7	GCCGAATTCGTGCAGCAGTGG	237	GCCCGCTGGCTGCCGGAC	561
PmxA-A6	GCCGAATTCGTGCAGCAGTGG	237	GCCCGCTGGCTGCCGGAC	561
	*****		*****	
Leu1Pa-F	GCCGAATTCGTGCAGCAGTGG		GTCCGGCAGCCAGCGGGC	Leu1Pa-R

Figure 51 : Alignement de séquences nucléiques des domaines d'adénylation impliqués dans l'incorporation de la leucine dans les synthétases PmxA des polymyxines A et B.

Après criblage des 28 clones, 4 clones (notés 73, 42, 57 et 80) contenant les fragments de 350 pb ont été sélectionnés avec ces amorces (Figure 52).

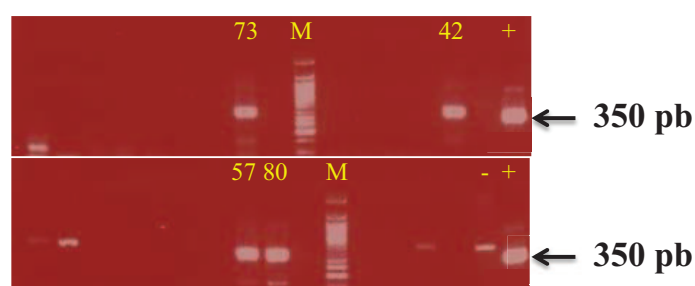


Figure 52 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR sur colonies avec les amorces Leu1Pa-F et Leu1Pa-R (350 pb).

Puits 73, 42, 57 et 80 indiquent le numéro des clones positifs ayant l'insert de 350 pb ; Puits (+) les témoins positifs contenant l'ADN des souches B-LR et PKB1 ; Puits (-) le témoin négatif contenant l'ADN de la souche *E. coli* EPI100-T1R ; Puits M le marqueur de taille 50 pb DNA Ladder. (Gel agarose 1% ; TBE 1X ; 1 h à 100 V).

▪ Amorces IsoL-F/IsoL-R

Comme précédemment, ces amorces ont été définies à partir des alignements de séquences nucléiques des domaines d'adénylation intégrant l'isoleucine dans les synthétases de la bacitracine (BacA et BacC), de la fengycine (FenE) et de la lichenysine (LicC) des *Bacillus licheniformis* et *B. subtilis* (Figure 53). La taille des fragments attendue pour ce couple d'amorces est de 235 pb. Cependant lors des tests PCR *in vitro* avec l'ADN des deux souches B-LR et PKB1 utilisés comme témoins positifs, ces amorces amplifient 2 bandes intenses de 250 et 900 pb. Avec l'amplification de ce fragment à 900 pb non attendu (Figure 54), on peut dire que ces amorces dégénérées sont moins spécifiques. Elles ont permis de sélectionner 11 clones sur les 28 précédents.

domaine A	5'	3'	5'	3'
BacA-IleA5	CAATCCCGATCGGCAGCCCG	372	GGCTGCCAGACGGCAACAT	587
BacC-IleA8	CGATTCCGATCGGCAGCCCG	371	GGCTGCCAGACGGCAACAT	586
BacA-IleA1	CGATTCCGATCGGCAGCCCG	372	GGCTGCCAGACGGCAACAT	587
FenE-IleA10	CTATCCCGATCGGGAACCG	368	GGCTGCCAGATGGGAACCT	580
LicC-IleA7	CCATTCCGATCGGCAAGCCG	372	GGCTGCCGGACGGCAATAT	587
	* ** ***** *	***	***** ** ** *	
IsoL-F	CNATYCCGATCGGSARVCCG		AKRTTSCCRTCHGGCAGCC	IsoL-R

Figure 53 : Alignement de séquences nucléiques des domaines d'adénylation impliqués dans l'incorporation de l'isoleucine dans les synthétases de la bacitracine, de la fengycine et de la lichenysine pour définir les amorces dégénérées IsoL.

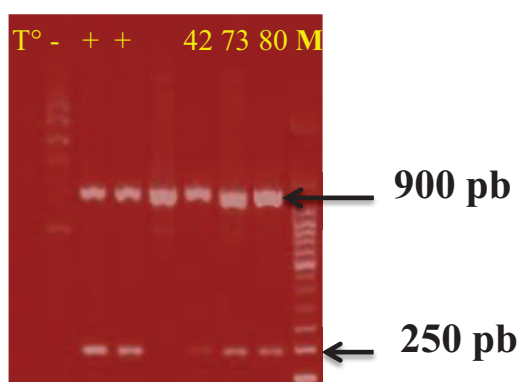


Figure 54 : Gel d'électrophorèse du criblage par PCR sur colonies avec les amorces IsoL-F et IsoL-R (250 pb).

Puits 42, 73 et 80 indiquent le numéro des clones positifs ayant l'insert de 250 pb ; Puits T° le témoin sans ADN ; Puits (-) le témoin négatif contenant l'ADN de la souche *E. coli* EPI100-T1R ; Puits (+) les témoins positifs contenant l'ADN des souches B-LR et PKB1 ; Puits M le marqueur de taille 50 pb DNA Ladder. (Gel agarose 1% ; TBE 1X ; 1 h à 100 V).

▪ Amorces Pro3-F/Pro3-R

Comme précédemment, ces amorces ont été définies à partir des alignements de séquences nucléiques des domaines d'adénylation intégrant la proline à partir des synthétases de la tyrocidine (TycB) et de la gramicidine (GrsB) de *Brevibacillus brevis*. Notons que ces mêmes domaines d'adénylation retrouvés dans les synthétases de la mycosubtiline, de l'iturine, de la pristinamycine, de la fengycine ou encore de l'actinomycine ont été exclus de cet alignement car elles ne permettaient pas d'obtenir des motifs conservés. La Figure 55 montre les

alignements et les motifs conservés qui ont permis d'obtenir le couple d'amorces dégénérées Pro3-F/Pro3-R spécifique de la proline.

domaine A	5'	3'	5'	3'
TycB-ProA2	CACAATCACTACGGCCCGTC	943	GAATGTACCGAACGGGTGAT	1205
GrsB-ProA2	CACAATCATTTATGGTCCATC	942	GGATGTACCGAACAGGGGAT	1203
	***** ** ** *		* ***** ** **	
Pro3-F	CACAATCAYTAYGGYCCRTC		ATCMCCYGTTCGGTACATYC	Pro3-R

Figure 55 : Représentation schématique des alignements de séquences nucléiques des domaines d'adénylation impliqués dans l'incorporation de la proline dans les synthétases de la tyrocidine et de la gramicidine pour définir les amorces dégénérées Pro3.

La taille des fragments attendue est de 280 pb pour les amorces Pro3. Elles ont aussi permis de sélectionner 10 clones positifs sur les 28.

▪ Amorces pmxC-F/pmxC-R

Une dernière tentative de criblage a été effectuée avec des amorces non dégénérées. Ce couple d'amorces permet d'amplifier le gène *pmxC* codant pour un des transporteurs de la polymyxine A chez le *P. polymyxa* E681 (Choi *et al.*, 2009). Il permet d'amplifier des fragments de 1800 pb chez les souches témoins positifs B-LR et PKB1.

Les 28 clones de la banque ont ensuite été criblés par PCR en utilisant les amorces pmxC-F et pmxC-R pour rechercher les clones qui contiendraient le gène *pmxC*. Comme le montre la Figure 56, ce criblage a permis de sélectionner 10 clones positifs (notés 12, 35, 73, 42, 4, 5, 43, 57, 80 et 60) sur les 28 précédents.

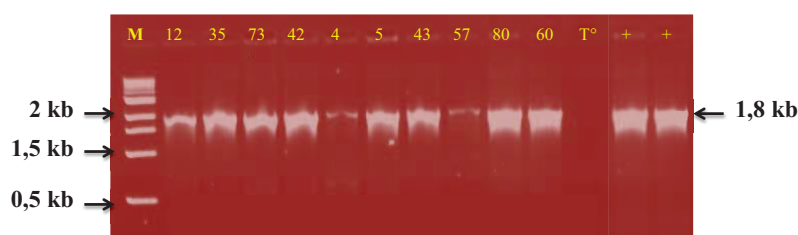


Figure 56 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR sur colonies avec les amorces pmxC-F et pmxC-R (1800 pb).

Puits 12, 35, 73, 42, 4, 5, 43, 57, 80 et 60 indiquent le numéro des clones positifs ; Puits T° le témoin sans ADN ; Puits (+) les témoins positifs contenant l'ADN des souches B-LR et PKB1 ; Puits M le marqueur de taille 1 kb DNA Ladder. (Gel agarose 0,7% ; TBE 1X ; 2 h à 100 V).

.V.2 Conclusion du criblage

En plus du criblage ciblant les domaines d'adénylation, nous avons également cherché à amplifier le transporteur *pmxC*.

L'analyse du tableau de criblage (Tableau 12) fait ressortir 4 groupes de clones :

- Le groupe 1 des clones **42/73/57/80** qui contiendraient tous les domaines d'adénylation testés ainsi que le gène *pmxC*. Ce groupe constitue le meilleur pour un éventuel séquençage.
- Le groupe 2 des clones **20/31/88/63** qui contiendraient les domaines d'adénylation intégrant la proline, l'isoleucine et l'acide L-2,4-diaminobutyrique.
- Le groupe 3 des clones **95/18/93** qui contiendraient les domaines d'adénylation intégrant l'isoleucine et l'acide L-2,4-diaminobutyrique. Ce groupe a été éliminé pour un séquençage car les clones ne contenaient ni les séquences intégrant la proline ni le gène *pmxC* qui code pour un des transporteurs des polymyxines. En effet on suppose que ce groupe 3 pourrait posséder que les 2 premiers acides aminés de la partie linéaire des composés à huit acides aminés produits par B-LR (Figure 47 p. 126).
- Le groupe 4 des clones **12/4/5/43/60** qui contiendraient en plus des domaines d'adénylation intégrant l'acide L-2,4-diaminobutyrique le gène *pmxC* impliqué dans le transport des polymyxines. Puisque les clones de ce groupe ne possèderaient qu'un seul domaine d'adénylation et donc un cluster tronqué, ils n'ont pas été sélectionnés pour le séquençage.

Notons que les clones **35 et 44** n'appartiennent à aucun groupe. Pour la suite de cette analyse nous avons sélectionné trois clones dans le groupe 1 (**42/73/80**) un clone dans le groupe 2 (**31**) et le clone **35**.

Le criblage de la banque B-LR a été effectué en se basant sur la structure des molécules antibiotiques définies par spectrométrie de masse basse résolution. Ce criblage n'était donc pas optimal car les structures n'étaient pas parfaitement définies.

Tableau 12 : Tableau du criblage par PCR sur colonies des 28 clones de la banque B-LR.

Boîtes d'origines de la banque B-LR																												
Clones Amorces	B _{LR} -1			B _{LR} -2					B _{LR} -3		B _{LR} -4	B _{LR} -5			B _{LR} -6			B _{LR} -7							B _{LR} -8		B _{LR} -10	
	17	20	44	12	35	58	73	75	20	62	20	13	42	95	18	20	39	4	5	31	43	57	80	81	88	93	60	63
Pro3 (280 pb)			+		+		+				+		+							+		+	+		+			+
Isoleucine (250 pb)							+				+		+	+	+					+		+	+		+	+		+
LeucinePa (350 pb)							+						+									+	+					
PmxC (1800 pb)				+	+		+						+					+	+		+	+	+				+	
L-Dab (395 pb)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

En vert le groupe1, en jaune le groupe 2, en rose le groupe 3 et en bleu le groupe 4. Les clones 35, 42, 31, et 57 ont été séquencés.

.V.3 Sélection des clones à séquencer

Les clusters de production des polymyxines décrits dans la littérature sont des clusters de grandes tailles (40,6 kb) (Choi *et al*, 2009 ; Shaheen *et al.*, 2011). Ainsi, pour sélectionner les inserts les plus grands en vue de leur séquençage, une vérification de la taille des 5 clones d'intérêts (**42/73/80 ; 31 et 35**) a été effectuée. L'ADN fosmidique de ces clones a été extrait puis digéré avec divers enzymes de restriction qui ont 1 ou 2 sites de coupures dans le fosmide pEpiFOSTM. La taille des inserts a ensuite été vérifiée par électrophorèse PFGE. La Figure 57 montre pour les clones 35, 73, 42 et 80 (le résultat du clone 31 n'est pas montré ici).

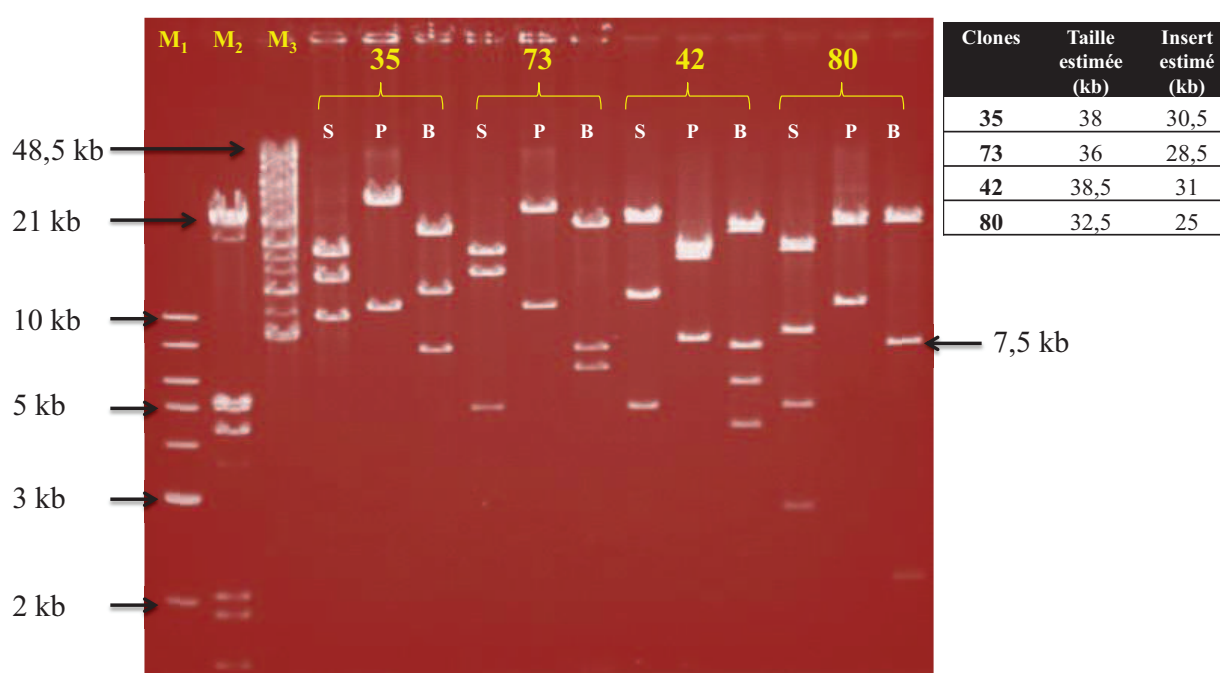


Figure 57 : Vérification par électrophorèse PFGE de la taille des inserts des clones positifs 35, 73, 42 et 80 après digestions enzymatiques.

L'ADN fosmidique des clones est extrait puis digéré avec les enzymes de restrictions *ScaI* (S), *PmlI* (P) et *BamHI* (B) qui coupent respectivement le vecteur fosmidique 1 à 2 fois. Les fragments obtenus sont séparés sur un gel d'agarose (agarose 1% ; TBE 1X ; 16 h à 6V/cm ; angle de 120°C). Puits M₁ (marqueur de taille 1 kb), M₂ (marqueur Lambda DNA/ EcoRI + HindIII) et M₃ (marqueur Lamda Mix 19). Le fragment de 7,5 kb (flèche à droite) représente le fosmide linéaire sans insert. La taille estimée des inserts est représentée dans le petit tableau à droite.

Les clones recombinants qui étaient digérés par *Bam*HI présentait au moins un site *Bam*HI dans l'insert, ce qui montre que la digestion de l'ADN génomique de B-LR lors de la construction de la banque était bien partielle. La taille des inserts vérifiés varie de 25 à 31 kb. Les profils de restriction obtenus après PFGE ont permis de sélectionner quatre clones qui possèdent un insert de grande taille (30-31 kb). Ces clones sont le clone **35**, le clone **31** dans le groupe 2 ainsi que les clones **42 et 57** dans le groupe 1. Ces clones sélectionnés ont ensuite été séquencés (Roche GS FLX).

VI ANALYSE *IN SILICO* DES SÉQUENCES

Le séquençage de ces 4 clones a permis d'obtenir 4 séquences de 34 à 37 kb (insert). Trois d'entre elles (issues des clones 35, 42 et 57) ont pu être assemblées sur 50,4 kb. La quatrième séquence (clone 31) ne présente pas d'homologie avec les autres et ne contiendrait qu'un fragment de système NRPS. Seul le résultat de l'assemblage des séquences issues des clones 35, 42 et 57 sera donc discuté ici. Les cadres ouverts de lecture ou Open Reading Frame (ORFs) ont été recherchés dans les 50,4 kb. Au total 12 ORFs ont été retrouvés (Figure 58, Tableau 13).

Tableau 13 : Fonctions déduites, tailles et pourcentage d'identités des ORFs retrouvés après séquençage, avec des protéines homologues retrouvés chez les *Paenibacillus*.

ORFs [pb]	Cadre	Tailles pb	Tailles aa	% ID	Description	Microorganismes	Numéros d'accèsion
ORF1 [247-879]	+1	630	210	93	hypothetical protein	<i>P. alvei</i>	WP_021255919.1
ORF2 [1213-1710]	+1	495	165	93	GCN5-like N-acetyltransferase	<i>P. alvei</i>	WP_021257637.1
ORF3 [1766-2248]	+2	480	160	82	GCN5-like N-acetyltransferase	<i>P. dendritiformis</i>	WP_006674655.1
ORF4 [2397-2945]	+3	549	183	96	hypothetical protein	<i>P. alvei</i>	WP_021257635.1
				39	2'-5' RNA ligase	<i>Halobacillus halophilus</i>	WP_014642828.1
ORF5 [4380-5150]	-1	768	256	98	Phage-like protein	<i>P. alvei</i>	WP_021255912.1
ORF6 [5491-6327]	-2	834	278	98	aminoglycoside 6-adenylyltransferase	<i>P. alvei</i>	WP_021257631.1
ORF7 [7296-8588]	-1	1290	430	97	diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase	<i>P. alvei</i>	WP_021255909.1
ORF8 [9275-24271]	+2	14997	4967	94	PmxA	<i>P. polymyxa</i>	AEZ51516.1
ORF9 [24424-27732]	+1	3309	1102	96	PmxB	<i>P. polymyxa</i>	AEZ51517.1
ORF10 [27722-29548]	+2	1824	608	96	PmxC	<i>P. polymyxa</i>	AEZ51518.1
ORF11 [29545-31278]	+1	1731	577	96	PmxD	<i>P. polymyxa</i>	AEZ51519.1
ORF12 [31568-50446]	+2	18879	6292	95	PmxE	<i>P. polymyxa</i>	AEZ51520.1

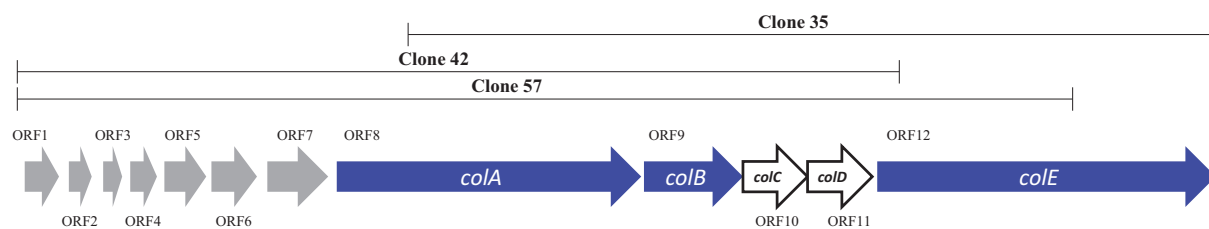


Figure 58 : Organisation et annotation des ORFs retrouvés sur 50,4 kb avec le cluster *col* de production putatif de la colistine chez le *Paenibacillus* B-LR.

L'assemblage des séquences des clones 35, 42 et 57 a permis d'obtenir les ORFs en amont du cluster ainsi que le cluster complet *col*.

L'analyse *in silico* a permis d'identifier un cluster de gènes de 40,7 kb appelé « cluster *col* ». Ce cluster *col* contient 5 cadres ouverts de lecture nommés *colA*, *colB*, *colC*, *colD* et *colE* (Figure 59A p. 139). La comparaison entre le cluster *col* et les clusters *pmx* décrits dans la littérature montre le même nombre de gène et la même organisation (Tableau 13). Par homologie de séquences avec les clusters *pmx*, les gènes *colA*, *colB*, et *colE* ont été identifiés comme codant pour des synthétases NRPS. Une étude *in silico* a permis de prédire l'implication de ces synthétases dans l'assemblage d'un variant de la colistine chez le *Paenibacillus* B-LR (<http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de/>, <http://antismash.secondarymetabolites.org/> et <http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>). L'analyse BLAST des gènes *colC* et *colD* identifiés au milieu du cluster *col* suggère que ces gènes codent pour des transporteurs ABC.

.VI.1 Analyse du cluster NRPS de production de la colistine chez B-LR

D'après les prédictions *in silico*, les 3 gènes *colA*, *colB* et *colE* coderaient pour des synthétases non-ribosomiques impliquées dans la biosynthèse de la colistine. *colA* (14,9 kb) code pour une protéine de 4967 aa, *colB* (3,3 kb) code pour une protéine de 1102 aa et *colE* (18,9 kb) code pour une protéine de 6292 aa. Les séquences protéiques codées par ces 3 ORFs ont été analysées avec des logiciels de prédiction en ligne (<http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de/>, <http://antismash.secondarymetabolites.org/> et <http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>) pour déterminer l'agencement modulaire du cluster NRPS ainsi que les monomères potentiellement incorporés (Figure 59B p. 139). Les analyses de séquences effectuées par analogie avec ce qui a été décrit pour les polymyxines ont révélées que *colE* code pour 5 modules NRPS responsables

de l'incorporation des cinq premiers acides aminés de la colistine, *colA* code pour 4 modules incorporant les quatre acides aminés suivant et *colB* code pour un seul module responsable de l'incorporation du dernier acide aminé de la colistine. Cette analyse montre que l'ordre et la disposition de ces 3 gènes codant pour des NRPS au sein du cluster ne sont pas colinéaires avec les acides aminés composant la colistine. Cet agencement des ORFs ressemble à l'agencement retrouvé dans les clusters *pmx* de production de la polymyxine A chez *P. polymyxa* E681 (Choi *et al.*, 2009), de la polymyxine B chez *P. polymyxa* PKB1 (Shaheen *et al.*, 2011) et de la polymyxine P chez *P. polymyxa* M-1 (Niu *et al.*, 2013). Étant donné que dans la molécule de colistine on a une cyclisation interne, on peut supposer qu'on est en présence d'un peptide produit par biosynthèse non linéaire (type C) (Mootz *et al.*, 2002).

Les comparaisons des séquences protéiques du cluster *col* de BL-R avec les séquences protéiques des clusters *pmx* des souches PKB1, E681 et ATCC21830 montrent des fortes homologues de séquences (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison des séquences protéiques du cluster *col* avec les clusters *pmx* des souches de *P. polymyxa* PKB1, E681 et ATCC21830 productrices de polymyxines B, A et E respectivement.

Séquences	Tailles		% ID séquences protéiques <i>pmx</i>		
	pb	aa	PKB1	E681	ATCC21830
<i>colA</i>	14901	4967	94	90	96
<i>colB</i>	3306	1102	96	95	96
<i>colE</i>	18879	6292	95	96	84

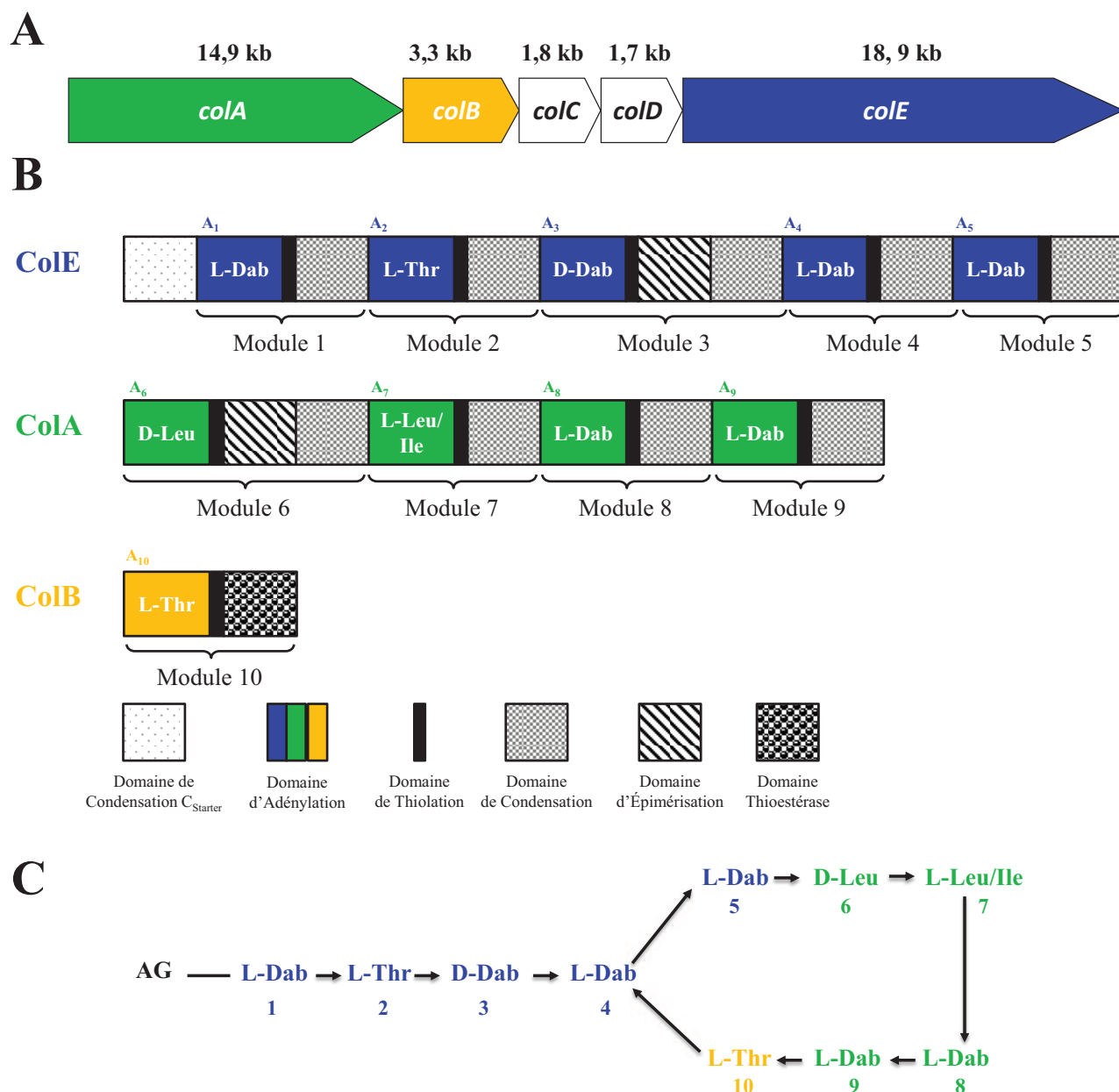


Figure 59 : Cluster de gènes putatif de biosynthèse de la colistine (*col*) chez le *Paenibacillus* B-LR et déduction de la structure primaire de la colistine synthétisée.

(A) Structure des gènes *col*. Les flèches vert, jaune et bleue représentent les gènes NRPS (*colA*, *B* et *E*) et les flèches blanches les ABC transporteurs (*colC* et *D*). Les chiffres en kb indiquent la taille de chaque ORF.

(B) Disposition des modules et domaines NRPS lors de la biosynthèse de la colistine. Les gènes *colE* et *colA* contiennent un domaine d'épimérisation qui est responsable de la conversion stéréochimique des L acides aminés en D.

(C) Structure primaire de la colistine synthétisée par le *Paenibacillus* B-LR obtenue à partir de la prédiction des acides aminés intégrés par les domaines A. Les 10 acides aminés sont intégrés par les gènes *colE*, *colA* et *colB*.

AG = Acide Gras, Dab = acide-2,4 Diaminobutyrique, Leu = Leucine, Ile = Isoleucine et Thr = Thréonine. A₁ à A₁₀ indique les numéros des domaines d'adénylation.

Chaque module identifié est composé de trois ou quatre domaines organisés comme suit : A-T-C, A-T-E-C ou A-T-Te (Figure 59B). Les domaines identifiés chez B-LR vont être analysés et comparés à ceux décrits dans la littérature.

- **Domaines de condensation**

Dans un module NRPS, le domaine de condensation (C) est responsable de la formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés adjacents activés par les domaines d'adénylation de deux modules consécutifs (Strieker *et al.*, 2010). Les prédictions *in silico* ont montré que les synthétases *colE* et *colA* contiennent respectivement 5 et 4 domaines C (Figure 59B p. 139). En plus de ces neuf domaines de condensation on retrouve dans la partie N terminale de la synthétase *colE* un domaine C_{Starter} qui se distingue des autres domaines C trouvés. La présence de ce type de domaine C_{Starter} a déjà été rapportée dans les lipopeptides où ce domaine est responsable de la formation d'une liaison amide entre un acide gras en début de chaîne et le premier acide aminé sélectionné par le module d'initiation de la synthétase (Konz *et al.*, 1999 ; Rausch *et al.*, 2007). Cette fixation de l'acide gras est essentielle et est considérée comme la première étape dans la biosynthèse des lipopeptides. Cependant dans la biosynthèse des polymyxines, le mécanisme d'incorporation de la partie acide gras au peptide reste encore inconnu. Ces domaines C_{Starter} sont retrouvés par exemple dans les clusters NRPS de la fusaricidine (Li *et al.*, 2007), de l'arthrofactine (Roongsawang *et al.*, 2003), ou encore de la surfactine (Cosmina *et al.*, 1993).

- **Domaines d'adénylation**

Le domaine d'adénylation (A) est responsable de la sélection de l'acide aminé et de son activation pour l'incorporer dans le peptide final (Stachelhaus *et al.*, 1995). La découverte des motifs conservés propres aux différents domaines (Marahiel *et al.*, 1997) ainsi que celle du code conférant la spécificité des domaines A ou code Stachelhaus (Stachelhaus *et al.*, 1999, Challis *et al.*, 2000) a permis le développement de différents algorithmes disponibles en ligne. Ces outils sont utilisés pour analyser les domaines NRPS et pour prédire la spécificité d'un substrat pour un domaine A, à partir des séquences protéiques des synthétases. Dans cette étude, les outils de prédiction en ligne ont été utilisés pour analyser la structure modulaire de la colistine synthétase et déterminer la spécificité des substrats incorporés par les domaines A dans chaque module (Figure 59B p 139).

Ces programmes ont identifiés la présence de 4 domaines A pour *colA*, un pour *colB* et cinq pour *colE* dans le cluster *col*. Les acides aminés prédis pour les domaines A de *colA* sont

respectivement Leu-6, Leu/Ileu-7, Dab-8 et Dab-9, avec l'acide diaminobutyrique (Dab) qui est un acide aminé non protéinogène. Le domaine A₇ de *colA* a été prédit pour activer une Leucine ou une Isoleucine par les algorithmes. Le domaine A de *colB* activerait préférentiellement la Thr-10 et les domaines A de *colE* activeraient respectivement les acides aminés Dab-1, Thr-2, Dab-3, Dab-4 et Dab-5. Dans le module 10 qui active la Thr-10 on retrouve un domaine thioestérase, ce qui indique probablement la fin et la libération du peptide. Il n'y a pas d'information spécifique dans la séquence du gène *colB* qui indique comment le domaine thioestérase catalyse la réaction de cyclisation entre les acides aminés Thr-10 et Dab-4. La composition en acide aminés obtenue est identique à celle de la colistine à la différence de certains aa qui seraient de série L dans la colistine et de série D dans les molécules produites par B-LR. En se basant sur la structure des polymyxines, l'ordre des modules pour l'assemblage des acides aminés lors de la synthèse de la colistine chez le *Paenibacillus* B-LR devrait être *ColE-ColA-ColB*. Ainsi la structure de cette colistine produite a été déduite à partir des acides aminés prédits (Figure 59C p. 139).

Chaque domaine d'adénylation contient une signature de dix acides aminés impliqués dans la reconnaissance de chaque substrat. Les outils d'analyse des NRPS utilisés ont permis d'extraire ces 10 acides aminés pour chaque domaine A de la colistine synthétase (Tableau 15).

Tableau 15 : Prédiction des acides aminés incorporés par les domaines d'adénylation de la colistine synthétase à partir des signatures de reconnaissance du substrat.

Domaine-A	Position des acides aminés du site actif										Acide aminé spécifique prédit	Acide aminé dans la colistine
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517		
A ₁ - <i>colE</i>	D	V	G	E	I	S	S	I	D	K	Dab	Dab
A ₂ - <i>colE</i>	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	Thr	Thr
A ₃ - <i>colE</i>	D	V	G	E	L	S	S	I	D	K	D-Dab	L-Dab
A ₄ - <i>colE</i>	D	V	G	E	I	S	A	I	D	K	Dab	Dab
A ₅ - <i>colE</i>	D	V	G	E	I	S	A	I	D	K	Dab	Dab
A ₆ - <i>colA</i>	D	A	W	I	V	G	A	I	V	K	D-Leu	D-Leu
A ₇ - <i>colA</i>	D	G	F	F	L	G	V	V	Y	K	Leu/Ileu	Leu
A ₈ - <i>colA</i>	D	V	G	E	I	S	A	I	D	K	Dab	Dab
A ₉ - <i>colA</i>	D	V	G	E	I	S	A	I	D	K	Dab	Dab
A ₁₀ - <i>colB</i>	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	Thr	Thr

Les signatures identifiées *in silico* dans le cluster *col* de B-LR (Tableau 15) ont été ensuite comparées à celles des souches de *Paenibacillus* productrices de polymyxines décrites dans la littérature (Tableau 16).

Tableau 16 : Comparaison des acides aminés conférant la spécificité des domaines d'adénylation des polymyxines synthétases des souches E681, PKB1, ATCC21830, M-1 et B-LR.

<i>colE</i> , 5 domaines A										
	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄		A ₅	
E681	DVGEISSIDK	Dab	DFWNIGMVHK	Thr	DVGEISSIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
21830	DVGEISSIDK	Dab	DFWNIGMVHK	Thr	DVGEISSIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
PKB1	DVGEISSIDK	Dab	DFWNIGMVHK	Thr	DVGEISSIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
M-1	DVGEISSIVK	Dab	DFWNIGMVHK	Thr	DVGEISSIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
B-LR	DVGEISSIDK	Dab	DFWNIGMVHK	Thr	DVGE L SSIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab

<i>colA</i> , 4 domaines A								
	A ₆		A ₇		A ₈		A ₉	
E681	DAWIVGAIVK	Leu	DFWNIGMVHK	Thr	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
21830	DAWIVGAIVK	Leu	DG FLL GLVYK	Leu	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
PKB1	DAWTIAAIAK	Phe	DG FLL GLVYK	Leu	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
M-1	DAWTIAAIAK	Phe	DFWNIGMVHK	Thr	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab
B-LR	DAWIVGAIVK	Leu	DG F L GVVYK	Leu/Ileu	DVGEISAIDK	Dab	DVGEISAIDK	Dab

<i>colB</i> , 1 domaine A		
	A ₁₀	
E681	DFWNIGMVHK	Thr
21830	DFWNIGMVHK	Thr
PKB1	DFWNIGMVHK	Thr
M-1	DFWNIGMVHK	Thr
B-LR	DFWNIGMVHK	Thr

Les souches E681 (polymyxine A) et ATCC21830 (polymyxine E) sont décrites dans le brevet US 8,329,430. La souche PKB1 produit un variant de la polymyxine B (Shaheen *et al.*, 2011). La souche M-1 produit la polymyxine P (Niu *et al.*, 2013). La souche B-LR produit un variant de la colistine (cette étude).

Les synthétases de B-LR se distinguent au niveau du troisième domaine d'adénylation de *colE* qui intègre un acide diaminobutyrique (Dab), et du septième domaine d'adénylation de *colA* qui intègre une leucine ou une isoleucine. Ces spécificités amèneraient donc la bactérie à produire un variant de la colistine.

- **Domaines de thiolation**

Dans le cluster de la colistine synthétase, dix domaines de thiolation (T) ont été identifiés. Chaque domaine T fixe de manière covalente l'acide aminé préalablement activé par le domaine A sur la synthétase (Stachelhaus *et al.*, 1996, Weber *et al.*, 2000). Deux de ces domaines T (T₃ et T₆) sont en amont de domaines d'épimérisation (Figure 59B p 139). L'alignement des domaines T du cluster *col* montre deux types de motifs conservés : le motif LGGDSI pour les domaines T₃ et T₆ en amont de domaines E et le motif xGGHSL commun aux domaines T en amont des domaines C (Marahiel *et al.*, 1997 ; Linne *et al.*, 2001) (Figure 60).

T8-L-Dab	TKLAAIWQEVLGLAKEIGVHDNFFDI GGHSL RATTLVSKVHKELSVDLPLRDVFRHSTIE
T9-L-Dab	TKLAAIWQEVLGLAKEIGVYDNFFDI GGHSL RATTLAGKVFKELNVNPLPLRDVFRHSTIA
T5-L-Dab	AKLVAIWQDVLG-PVTIGVTDNFFDL GGHSL RATTLVSKVHKELSVDLPLRDVFRHSTIE
T7-L-Leu	ASLAGIWKSVLG-LVHIGVHDNFFDM GGHSL RATTLVSKVHQELNVELPLRDVFRYSTIE
T4-L-Dab	AKLAAIWQEVLVREKAVGVTDNFFDL GGHSL RATTLVSKMHKELGIEFPLRDVFRYSTVE
T2-L-Thr	SQLVKIWEEVLG-YSGIGVMDNFFEL GGHSL RATNLVSKIRKEMNVEFPLRDVFRYMTVE
T1-L-Dab	TRLALIWQQVLG-IARVGVEDDFFDL GGHSL RASTLVSKIRKELQVEVPLRDVFRYTTIK
T10-L-Thr	MKIARVWQDTLG-VPQGVKDNFFDL GGNLS SLMRLVQAVYDETGIEIPLNRQFHHVTVE
T3E-D-Dab	QALALVWQSVLG-VDQVGTMDNFFAL GGDSI KALQVSSRL-LQTGYKLIMKDLFHYPTIS
T6E-D-Leu	RTLVDVWQAVLN-ADRVGVTDHFFEL GGDSI KSIQVSSRLH-QAGYKLDIRDLFKYPTIS

Figure 60 : Alignement des séquences d'acides aminés des dix domaines de thiolation du cluster *col* chez B-LR

Les motifs conservés LGG(D/H)S(L/I) ou LGGxSL sont soulignés en vert. Dans les motifs conservés, l'acide aminé avant le résidu sérine (S) est indiqué en gras. Le résidu (D) avant le résidu (S) est nécessaire pour l'interaction avec le domaine d'épimérisation et pour la racémisation des acides aminés (Marahiel *et al.*, 1997).

Le résidu acide aspartique (D) qui est situé avant le résidu sérine conservé (S) serait essentiel pour une bonne interaction entre le domaine T et le domaine E, et pour la racémisation ultérieure de l'acide aminé L en son isomère D (Linne *et al.*, 2001). Le dernier domaine T₁₀ situé avant le domaine thioestérase contient un motif LGGNSLR. Il se pourrait que le résidu asparagine (N) situé avant le résidu sérine conservé interagisse avec le domaine Te lors de la cyclisation de la molécule (Shaheen *et al.*, 2011).

- **Domaines d'épimérisation**

Une des caractéristiques des peptides non-ribosomiques est la présence d'acides aminés de type D (Stachelhaus & Walsh, 2000). Habituellement, un L acide aminé est activé par le

domaine A, qui ensuite l'incorpore directement. Mais parfois, cet acide aminé de série L qui a été activé peut être converti en forme D par un domaine d'épimérisation (E) avant la formation de la liaison peptidique.

Selon les prédictions *in silico*, deux domaines d'épimérisation ont été identifiés dans les modules 3 et 6 du cluster *col* de B-LR (Figure 59B p 139). Ceci suggère un changement stéréochimique des acides aminés présents à ces endroits. Ainsi les acides aminés présents en position 3 (Dab-3) et en position 6 (Leu-6) seraient sous forme D.

Dans les polymyxines rapportées dans la littérature, il est très rare d'observer un D-Dab en position 3 sauf pour les polymyxines A, C et P. Lors de la caractérisation du cluster de la polymyxine B, Shaheen *et al*, ont aussi identifiés un domaine E dans le troisième module du cluster *pmx*. Ceci suggère l'intégration d'un D-Dab en position 3 alors que la polymyxine B intègre normalement un L-Dab. Les auteurs en ont donc déduit que leur bactérie (PKB1), produirait un variant de la polymyxine B.

- **Domaines thioestérase**

Un domaine thioestérase (Te) a été trouvé dans le dernier module de la synthétase *colB* (Figure 59B p 139). Les domaines Te sont souvent trouvés à l'extrémité C-terminal du module de terminaison où ils catalysent la libération de la chaîne peptidique par hydrolyse et parfois par macrocyclisation du peptide (Strieker *et al.*, 2010).

- **Conclusion**

L'analyse bio-informatique des gènes codant pour les synthétases *col* de B-LR prédit une composition en acides aminés identique à celle des colistines (E₁ et E₂), ce qui est en accord avec les résultats obtenus en spectrométrie de masse.

La structure prédite présente néanmoins la particularité de posséder un D-Dab en position 3 alors que les colistines intègrent normalement un L-Dab. Par conséquent, en se basant sur ces prédictions *in silico* les colistines produites par B-LR pourraient représenter de nouvelles formes de colistine (Figure 59C p. 139).

.VI.2 Analyse des transporteurs *colC* et *colD*

Une des caractéristiques intéressante du cluster *col* est la présence des gènes *colC* (1824 pb) et *colD* (1731 pb) (Figure 59A p 139). L'analyse des séquences protéiques issues de ces deux gènes montre une faible homologie entre elles (38%). Le BLAST nucléotidique a révélé que les

gènes *colC* et *colD* présentent une grande homologie (96%) avec les gènes *pmxC* et *pmxD* des souches E681, PKB1 et M-1. L'analyse de la séquence des acides aminés montre que *colC* et *colD* appartiennent à la famille des protéines ABC transporteurs. La présence de gènes codant pour les ABC transporteurs a été rapportée pour de nombreux clusters NRPS chez les bactéries et les champignons où ils jouent un rôle dans le transport (export) des peptides produits (Guillemette *et al.*, 2004 ; Menges *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2014). L'architecture des protéines ColC et ColD est similaire à celle des protéines MdlB et MsbA qui sont des ABC transporteurs impliqués dans le mécanisme de défense contre les antibiotiques. La structure secondaire des protéines ColC et ColD a été déterminée en utilisant l'outil SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998 ; Mitaku & Hirokawa, 1999 ; Mitaku *et al.*, 2002). Cet outil prédit la présence de cinq hélices transmembranaires pour ColC et six pour ColD.

La position des deux transporteurs ColC et ColD en tandem au sein du cluster de la colistine synthétase suggèrent un rôle dans l'export et la résistance du micro-organisme producteur vis à vis de la colistine (Choi *et al.*, 2009).

.VI.3 Analyse des gènes en amont du cluster col

Sept ORFs putatifs ont été retrouvés en amont du cluster *col* (Figure 58 p. 137). L'analyse des séquences obtenues a permis de prédire la fonction putative des ORFs 2 et 3 comme étant des acétyltransférases (Tableau 13 p. 136). Elles présentent un pourcentage d'identité de 93 et 82% avec les GCN5-like N-Acétyltransférases (GNAT) de *P. alvei* et de *P. dendritiformis* respectivement. Les acétyltransférases appartiennent à la famille des acyltransférases et catalysent le transfert d'un groupement acétyle vers une amine (Vetting *et al.*, 2005). Les études menées par Komura et Kurahashi (1980, 1985) suggèrent qu'une acyltransférase serait nécessaire pour le transfert de l'acide gras vers les colistines. Ainsi ces deux gènes pourraient donc être impliqués dans l'incorporation des groupes acyles dans les colistines.

En amont de *colA* se retrouve l'ORF7 qui code pour une diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase. Cette enzyme a déjà été rencontrée chez les bactéries halophiles et halotolérantes telles que *Halobacillus halophilus* (Reshetnikov *et al.*, 2011) et a un rôle dans la synthèse de l'acide diaminobutyrique (Dab). La diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase est codée par le gène *ectB* (Saum & Muller, 2007 ; Reshetnikov *et al.*, 2011) qui fait partie d'un cluster de gènes *ectABC* responsable de la biosynthèse de l'ectoïne (Reshetnikov *et al.*, 2011).

La séquence en acides aminés codée par l'ORF7 présente un pourcentage d'identité de 50 % avec la protéine EctB de *H. halophilus* DSM2266 et des pourcentages d'identité de 50 à 89 % avec les protéines EctB de divers *Paenibacillus* (Tableau 17).

Tableau 17 : Comparaison de la séquence protéique de l'ORF7 de B-LR avec des gènes homologues à EctB chez les *Paenibacillus* et chez *Halobacillus halophilus*.

Microorganismes	Fonctions	% ID avec l'ORF7 de B-LR	Tailles (aa)	Numéros d'accessions
<i>P. polymyxa</i> E681	EctB	73	420	CP000154.1
<i>P. alvei</i> DSM 29	EctB	89	389	EJW20319.1
<i>P. polymyxa</i> M1	EctB	74	420	YP_005959913.1
<i>P. sp.</i> HGF5	EctB	50	430	EGG38373.1
<i>P. sp.</i> HGF7	EctB	65	434	EGL19185.1
<i>H. halophilus</i> DSM2266	EctB	50	429	ABX39524.1

La synthèse de l'acide diaminobutyrique (Dab) est réalisée par la diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase codée par *ectB*. La séquence protéique de l'ORF7 de B-LR n'a pas été déposée sur Genbank (demande de brevet en cours pour le cluster de la colistine).

Fait intéressant, l'ORF7 (EctB) du *Paenibacillus* B-LR ne fait pas partie d'un cluster car il n'a pas été identifié d'homologues des gènes *ectA* ou *ectC* dans les séquences obtenues. Ceci suggère que B-LR ne produirait pas d'ectoïne et que l'homologue du gène *ectB* chez B-LR pourrait synthétiser l'acide diaminobutyrique que l'on retrouve dans les colistines produites.

En 2009, Choi *et al* ont aussi identifiés un gène homologue à *ectB* lors du séquençage du génome de *P. polymyxa* E681. Cependant ils n'ont pas indiqués si ce gène homologue était retrouvé à proximité du cluster *pmx* ou ailleurs sur le chromosome de la bactérie.

VII ÉTUDE DU RÔLE DU CLUSTER COL DANS LA BIOSYNTHÈSE DES COLISTINES

Afin de démontrer le rôle du cluster *col* identifié chez le *Paenibacillus* B-LR dans la biosynthèse des colistines nous avons tenté d'inactiver les gènes *colA* et *colE* par mutagenèse insertionnelle. Cette technique repose sur l'intégration d'une cassette de résistance à un antibiotique à l'intérieur du gène que l'on souhaite inactiver. Ces deux gènes ont été choisis car

ils seraient directement impliqués dans la biosynthèse de la molécule d'après les prédictions *in silico*. L'antibiotique choisi pour cribler les mutants a été l'apramycine.

.VII.1 Stratégie d'inactivation du gène *colA*

Une séquence de 1000 pb située dans le domaine d'adénylation A₇ du gène *colA* a été sélectionnée et amplifiée par PCR avec les amorces PmxAshunt-F et PmxAshunt-R (Tableau 6 p. 82) en créant les sites de restrictions *EcoRI* et *HindIII*. L'amplification a été effectuée avec l'ADN fosmidique du clone 57. La séquence amplifiée est digérée par *EcoRI* et *HindIII* puis clonée dans le plasmide pOJ260 préalablement digéré avec les mêmes enzymes et contenant un gène de résistance à l'apramycine. Le plasmide recombinant pOJ260ΔAshunt obtenu a été introduit dans B-LR par électroporation. La sélection des mutants ayant subi un événement de recombinaison a été effectuée par culture sur milieu gélosé LB supplémenté en apramycine.

Trois transformants nommés m5, m8 et m12 ont été sélectionnés puis analysés pour vérifier l'inactivation du gène *colA*. Des couples d'amorces ColA₂-F/ColA₂-F, F-H₃/R-H₃ et F-E₁/R-E₁ (Tableau 6 p. 82) ont été mis au point et utilisés pour vérifier la présence et l'emplacement de la cassette de résistance à l'apramycine. Malheureusement, seule la présence de la cassette de résistance Apr^R (804 pb) a pu être mise en évidence au sein des transformants m5, m8 et m12 par comparaison avec la souche sauvage B-LR qui ne contient pas cette cassette de résistance. Cette vérification a été effectuée avec les amorces Apra-F et Apra-R (Figure 61).

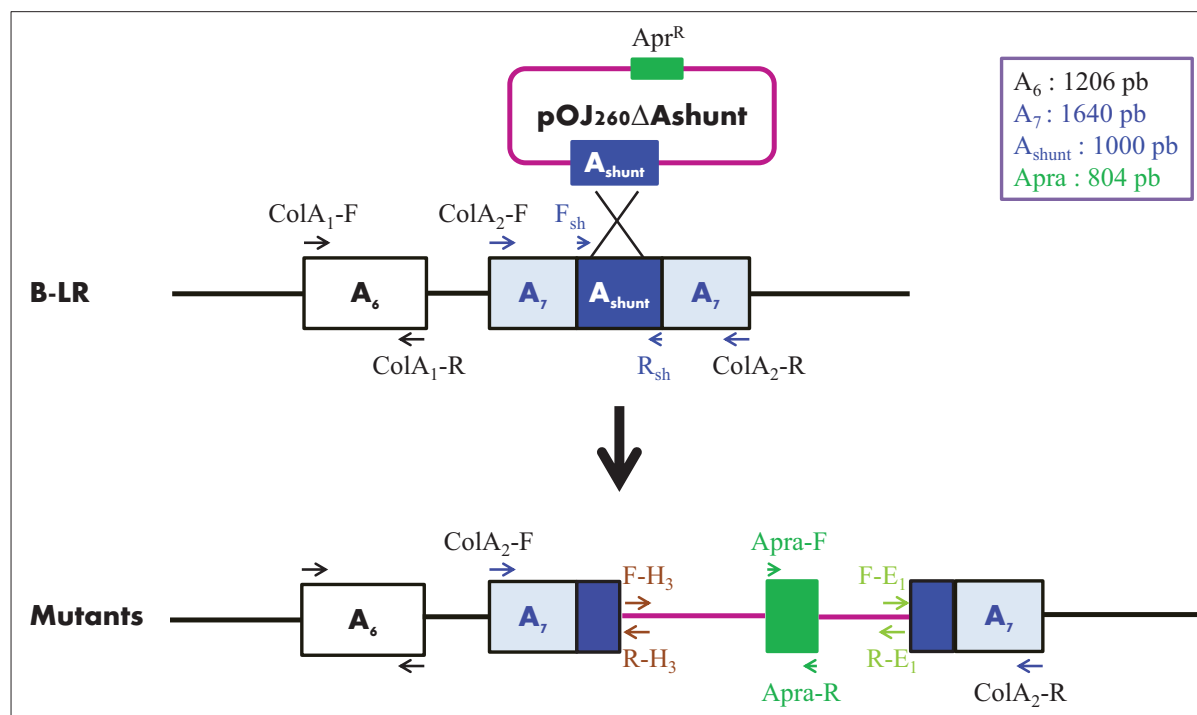


Figure 61 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour inactiver le gène *colA* par simple recombinaison homologue chez le *Paenibacillus* B-LR.

Un fragment de 1000 pb (A_{shunt}) du gène *colA* a été amplifié par PCR puis cloné dans le plasmide pOJ260 contenant la cassette de résistance à l'apramycine pour obtenir le plasmide recombinant pOJ260ΔAshunt. Ce plasmide a ensuite été introduit dans la souche B-LR par électroporation. La sélection des mutants s'effectue sur milieu gélosé contenant 30 µg/mL d'apramycine. La résistance à cet antibiotique a été utilisée pour sélectionner les mutants ayant subi un événement de recombinaison. Les flèches indiquent les amorces utilisées chez B-LR et les mutants pour vérifier l'inactivation du gène *colA*. A₆ et A₇ représentent les domaines d'adénylation dans le gène *colA*. La présence de la cassette apramycine (Apr^R) a été mise en évidence chez les mutants.

Les couples d'amorces ColA₂-F/ColA₂-F, F-H₃/R-H₃ et F-E₁/R-E₁ n'ont pas permis de vérifier la bonne intégration du plasmide au sein du gène *colA* (Figure 61). Afin d'expliquer ce problème, nous avons émis l'hypothèse que l'insertion avait eu lieu ailleurs dans le chromosome de la bactérie B-LR. En effet les séquences des gènes NRPS étant très répétitives la recombinaison homologue pourrait se faire dans une autre séquence, voire dans un autre cluster de gènes. Les séquençages des génomes de *Paenibacillus polymyxa* ont révélé la présence dans une même souche de plusieurs clusters NRPS de production d'antibiotique de types polymyxines, fusaricidines, paenibactérine, bacitracine ou encore bacillorine (Kim *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2010 ; Huang & Youssef, 2012).

.VII.1.1 Phénotype des mutants

Les mutants m5, m8 et m12 obtenus ainsi que la souche sauvage B-LR ont été néanmoins cultivés sur milieu minimum M63T pendant 2 jours à 30°C sous agitation à 200 rpm. Les surnageants ont été récoltés par centrifugation puis chauffés 10 min à 100°C pour éliminer les bactéries résiduelles. Après refroidissement, 10 µL de surnageants ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur des boîtes de gélose molle préalablement ensemencées avec 10 µL d'une culture en phase stationnaire des souches sensibles *P. aeruginosa* BM0207 ou *P. stutzeri* BM0043. Les halos d'inhibitions de croissance ont été mesurés après une nuit d'incubation à 30°C ou 37°C. Les diamètres d'inhibitions obtenus étaient de 1,4 cm pour la souche sauvage B-LR et 0,76 à 0,8 cm pour les mutants (Figure 62).

On s'attendait à une perte totale de l'activité antimicrobienne. Cependant une diminution de l'activité antimicrobienne a été obtenue. Cette activité était pratiquement divisée par deux pour les mutants comparés à la souche sauvage B-LR.

L'activité antimicrobienne résiduelle des mutants pourrait étayer l'hypothèse d'une sélection d'un évènement de recombinaison ayant eu lieu ailleurs que dans *colA*. Ou encore, il se pourrait que la bactérie produise d'autres composés antibiotiques qui pourraient être actifs après inactivation du cluster de production de la colistine.

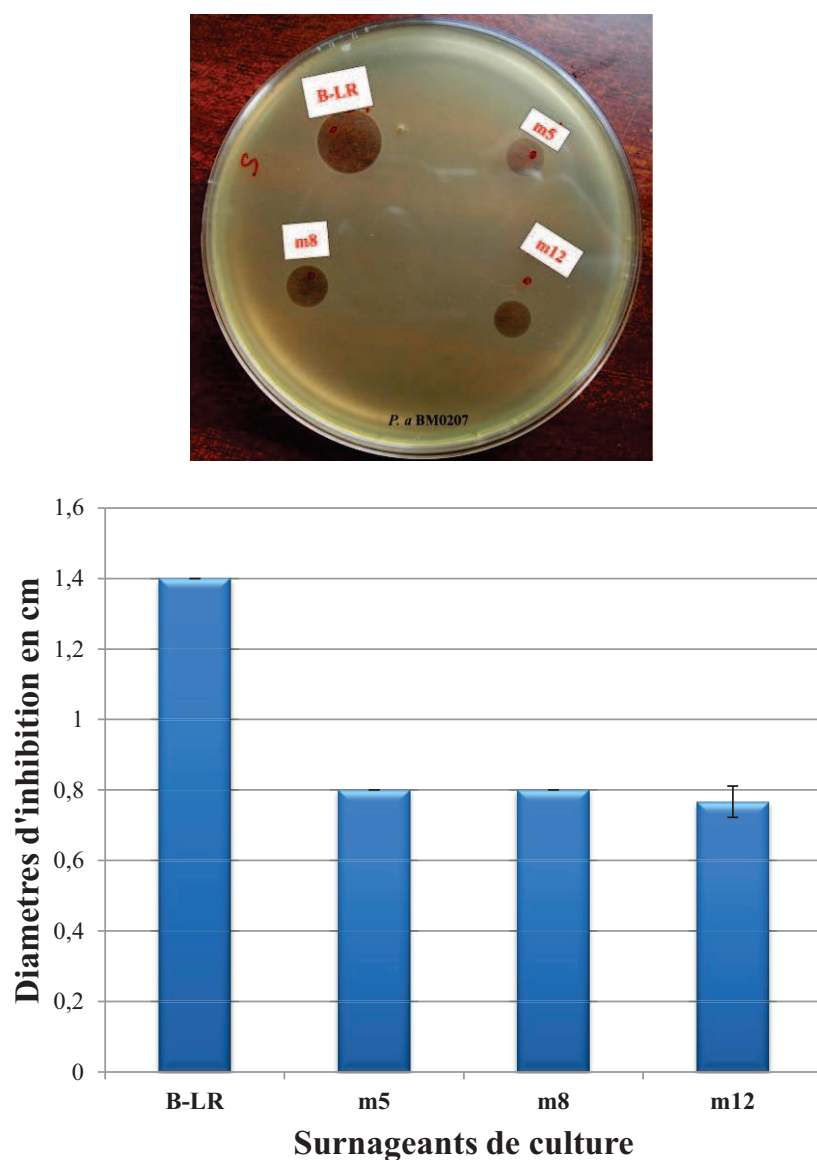


Figure 62 : Effet antimicrobien de 10 μ L du surnageant de culture de la bactérie B-LR et des mutants m5, m8 et m12 sur un tapis bactérien de *P. aeruginosa* BM0207.

La souche sauvage B-LR et les mutants ont été cultivés sur milieu minimum M63T pendant 48 H à 30°C. Les surnageants sont récoltés et testés sur la souche cible *P. aeruginosa* BM0207 par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après une nuit d'incubation à 37°C. Les tests ont été effectués en triplicatas pour chaque surnageant.

.VII.1.2 Difficultés méthodologiques liées à la souche

B-LR

Plusieurs problèmes méthodologiques liés à la manipulation de la souche B-LR ont été rencontrés durant ce travail.

Le premier problème vient du fait que cette souche est particulièrement mobile et envahissante. Une petite pique au centre d'une boîte de milieu gélosé suffit pour que la boîte soit totalement envahie après une nuit de culture à 28°C, 30°C ou 37°C. Il est donc impossible d'obtenir après culture des colonies isolées. Celles-ci forment toujours un tapis microbien. Cela pose un réel problème pour les expériences de mutagenèse et pour les dénombrements. En effet, au lieu d'isoler un mutant, c'est un prélèvement « au hasard » qui est effectué dans le tapis microbien.

En outre cette bactérie est capable de sporuler. Il est possible d'imaginer que des réels mutants détoxifient les géloses supplémentées en antibiotique permettant ainsi à des spores de germer ; ceci aboutissant à un mélange de formes végétatives mutées d'intérêts et de formes végétatives non mutées.

Cette bactérie flocule aussi en fin de croissance en milieu liquide. Les mesures de densité optique ne sont donc pas précises à 100%. Il est donc difficile de connaître dans ces conditions la quantité de bactérie présente en fin de croissance pour les dénombrements.

Le dernier problème méthodologique lié au *Paenibacillus* B-LR concerne son faible niveau d'efficacité de transformation. Ceci constitue un frein important pour les manipulations génétiques, en particulier pour la mutagenèse insertionnelle. Les difficultés rencontrées pour créer des mutants au cours de cette étude ont également été signalées par Li *et al* (2007) et par Choi *et al* (2009) lors de la caractérisation des systèmes génétiques de production de la fusaricidine chez *P. polymyxa* PKB1 et de la polymyxine A chez *P. polymyxa* E681 et par d'autres auteurs.

- « Although we succeeded in constructing a pmxE knockout mutant in this study, the low level of transformation efficiency of *P. polymyxa* E681 remains a bottleneck in genetic studies » (Choi *et al.*, 2009).
- « Direct homologous recombination between introduced DNA and *P. polymyxa* corresponding chromosomal loci has not been demonstrated previously probably due to

low efficiency of transformation or to the low efficiency of homologous recombination events » (Kim & Timmusk, 2013).

- « A transformation method using electroporation has previously been developed for one other *Paenibacillus* species, *P. polymyxa*, although it appears to be species-specific, producing a much lower transformation efficiency, or no transformants at all in two other *Paenibacillus* species closely-related to *P. polymyxa*—*P. azotofixans* and *P. macerans*, respectively » (Rosado *et al.*, 1994 ; Murray & Aronstein, 2008).

.VII.2 Croissance de la souche B-LR et des mutants en milieu supplémenté en acide diaminobutyrique

Jusqu'alors la bactérie B-LR était cultivée en milieu minimum M63T ne contenant que du tampon phosphate, du glucose, de l'azote minéral et de la thiamine. C'est un milieu qui oblige la bactérie à fabriquer elle-même tous les acides aminés qui vont composer la molécule finale de colistine (Figure 59C p. 139). Dans le mécanisme de synthèse des molécules de types polymyxines, l'acide aminé majoritairement retrouvé est l'acide diaminobutyrique (Figure 63). Il est présent au nombre de 6 dans les polymyxines. La souche B-LR ainsi que les mutants m5, m8 et m12 ont donc été cultivés sur milieu M63T et M63T supplémenté avec 200 µg/mL d'acide L-2,4 diaminobutyrique (L-Dab) de façon à évaluer l'impact de la présence du L-Dab sur la production des composés antibiotiques de la souche BLR et des mutants.

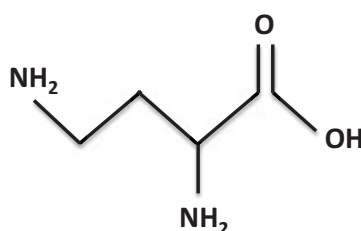


Figure 63 : Structure de l'acide diaminobutyrique (Dab) retrouvé dans les polymyxines.

Les cultures ont été effectuées pendant 2 jours à 30°C sous agitation. Les surnageants récoltés ont été testés pour leur activité antimicrobienne sur des boîtes de géloses molles préalablementensemencées avec une culture en phase stationnaire de la souche sensible *P. aeruginosa* BM0207. Après une nuit d'incubation à 37°C, les diamètres d'inhibitions ont été mesurés pour obtenir les phénotypes en présence d'acide diaminobutyrique. La Figure 64 présente les

résultats obtenus avec la souche BLR et le mutant m5 (les mutants m8 et m12 ne sont pas montrés).

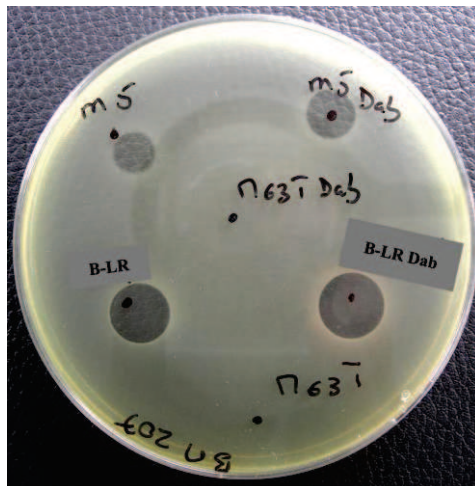


Figure 64 : Effet antimicrobien de 10 µL du surnageant de culture M63T et M63T supplémenté en Dab de la bactérie B-LR et du mutant m5 sur un tapis bactérien de *P. aeruginosa* BM0207.

La souche sauvage B-LR et le mutant m5 ont été cultivés sur milieu minimum M63T et sur M63T+200 µg/mL d'acide L-2,4 diaminobutyrique (L-Dab) pendant 48 h à 30°C. Les surnageants sont récoltés et testés sur la souche cible *P. aeruginosa* BM0207 par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les diamètres d'inhibitions sont mesurés après une nuit d'incubation à 37°C. Les tests ont été effectués en triplicatas pour chaque surnageant.

Lorsque l'acide L-2,4 diaminobutyrique est ajouté dans le milieu de croissance, l'activité antimicrobienne de la souche sauvage B-LR ainsi que celle des mutants contre *P. aeruginosa* BM0207 est plus importante comparée à celle obtenue pour une croissance en milieu M63T. Il a été constaté que cette augmentation de l'activité antimicrobienne était plus significative pour les mutants que pour la souche B-LR. Ces résultats montrent qu'il pourrait y avoir un nouveau phénotype de ces souches en présence d'acide diaminobutyrique.

L'augmentation de l'activité antimicrobienne pourrait également être due à une croissance plus importante des souches en présence de Dab. Afin de caractériser les composés antibiotiques produits par la souche BLR et ses mutants cultivés sur milieux supplémenté en L-Dab, les surnageants de culture ont été analysés par UPLC/MS.

.VII.3 Analyse des surnageants par UPLC-MS

Le surnageant de culture de la souche B-LR supplémenté avec 200 µg/mL d'acide diaminobutyrique (Dab) a été analysé et comparé au surnageant de B-LR cultivé sur M63T. Le chromatogramme obtenu montre que toutes les molécules identifiées chez B-LR étaient présentes dans le surnageant supplémenté en acide diaminobutyrique (Tableau 11 p. 111), avec une augmentation significative de la hauteur des pics correspondant aux colistines E₁, E₂, et Val-E₂. Ceci suggérerait que la quantité de colistines produites en présence d'acide diaminobutyrique augmente. Ces résultats sont en accord avec les résultats des tests antimicrobiens effectués (Figure 64 p. 153).

La comparaison des surnageants de culture de B-LR et des mutants m5, m8 et m12 par UPLC/MS montre une diminution de la hauteur des pics correspondant aux colistines E₁, E₂, et Val-E₂. Le clone m5 semble le plus concerné par cette diminution. Néanmoins les pics sont toujours présents, et cette diminution pourrait être simplement due à une croissance plus faible des mutants.

.VII.4 Bilan de la mutagénèse

Les difficultés méthodologiques rencontrées lors des cultures et des transformations du *Paenibacillus* B-LR ne nous ont pas permis d'obtenir un mutant au cluster *col* déficient.

D'autres stratégies sont en cours afin de démontrer le rôle de ce cluster dans la production de la colistine. Tout d'abord nous sommes en train d'envisager l'expression hétérologue de l'ensemble du cluster *col* chez *Bacillus subtilis*.

En parallèle nous avons débuté le clonage des 3 premiers domaines d'adénylation de *colA*. Nous avons pour objectif de produire et de purifier les protéines correspondantes. Nous pourrions ainsi établir *in vitro* quels aa sont spécifiquement activés par ces domaines.

C. Recherche de NRPS dans les micro-organismes issus de la vasière intertidale

Afin de valoriser les techniques de criblages développées pour découvrir les clusters NRPS de B-LR, nous avons effectué une étude sur des souches environnementales.

Les peptides non-ribosomiques sont de plus en plus recherchés en raison de leurs activités biologiques importantes et variées. Les micro-organismes producteurs de ces peptides sont pour la plupart des bactéries issues du sol tels que les *Actinomycètes* et les *Bacillus* (Cheng *et al.*, 2002 ; Horwood *et al.*, 2004). Des études récentes ont montré que les micro-organismes marins sont également devenus des sources importantes de peptides non-ribosomiques (Blunt *et al.*, 2008 ; Desriac *et al.*, 2013). Dans ce milieu, les éponges marines sont largement étudiées car elles abritent de nombreux micro-organismes différents (Li *et al.*, 2006) et produisant des peptides non-ribosomiques d'intérêt (Taylor *et al.*, 2007). Ainsi ces dernières années, de nombreux gènes de type NRPS associés aux éponges marines ont été détectés et étudiés en utilisant soit des techniques de criblage par PCR dégénérées (Jiang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2009), soit des approches de métagénomique (Schirmer *et al.*, 2005 ; Pimentel-Elardo *et al.*, 2012).

En revanche, les souches issues des sédiments marins et plus particulièrement des vasières intertidales sont encore peu étudiées. Dans notre laboratoire, une station d'étude de la vasière intertidale a été développée. Elle se situe à proximité de Brouage dans la baie de Marennes-Oléron en Charente Maritime. Des collègues ont constitué un soucier de micro-organismes prélevés dans cette station. Afin de déterminer si ces souches hébergeaient des séquences codant pour des NRPS, nous avons effectué un criblage par PCR dégénérées.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal FEMS Microbiology Letters et sont présentés dans l'article ci-dessous.

Conclusion et Perspectives

Parmi les substances antimicrobiennes produites par les *Paenibacillus* on retrouve les polymyxines et les fusaricidines. Ces molécules sont produites via des NRPS. Dans le cas de la Mucoviscidose, la colistine ou polymyxine E est utilisée comme antibiotique pour lutter contre les bactéries Gram-négatives multirésistantes responsables d'infections pulmonaires. Nos travaux avaient pour principal objectif l'étude de systèmes génétiques à l'origine de la production des peptides non-ribosomiques partageants des homologies avec les polymyxines et les fusaricidines chez les *Paenibacillus* B-LR et 32.

Ces travaux se sont articulés autour de trois axes principaux : i) Le premier axe avait pour objectif la caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution des molécules antibiotiques produites par la souche B-LR. ii) Le deuxième axe visait à identifier les clusters de gènes impliqués dans la production des composés antibiotiques chez les souches B-LR et 32. iii) Un troisième axe différent des deux premiers consistait à rechercher des nouvelles séquences codant pour des NRPS chez des microorganismes issus de la vasière intertidale.

- **Caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution des molécules antibiotiques de B-LR**

Dans ce premier axe nous avons caractérisés par UPLC-MS/MS les molécules antibiotiques contenues dans le surnageant de culture de la souche B-LR. Les résultats obtenus indiquent que le *Paenibacillus* B-LR produit 3 familles de lipopeptides : la première famille est constituée de molécules contenant des cycles de 5 acides aminés (aa), la seconde des cycles à 6 aa et la troisième des cycles à 7 aa.

La comparaison des molécules comportant des cycles à 5 et 6 aa montre que ces molécules ont en communs les aa (L-Dab₁-Leu/Ile₂-Pro₃-Ser₄-Ser₅-Tyr₆-) et un résidu Leu/Isoleu. La structure de ces molécules montre qu'elles sont peu cationiques. Elles comporteraient une seule charge positive portée par l'acide diaminobutyrique en position 1. Ces molécules pourraient être produites par un seul et même cluster NRPS qui reste à être identifié.

La troisième famille de molécules produites est constituée de décapeptides avec un cycle à 7 aa. Ces décapeptides sont la colistine E₁, la colistine E₂ et de la valine colistine E₂ (Val-E₂) décrits dans la littérature. Ces molécules sont cationiques avec 5 charges positives portées par les acides diaminobutyriques à pH physiologique.

Ainsi, ce premier axe nous a permis de confirmer que le *Paenibacillus* B-LR produit majoritairement les molécules Be1, Be2 (cycle à 5 aa) et les colistines E₁ et E₂ (cycle à 7 aa). Le

rôle biologique de Be1, Be2 et des cycles à 6 aa demeure inconnu. Des peptides de synthèse, mimant ces molécules ont été commandés (Bachem) afin de réaliser des tests biologiques (en cours).

○ **Caractérisation des systèmes génétiques de production des composés antibiotiques chez les souches B-LR et 32**

Dans le deuxième axe nous nous sommes intéressés à l'étude des gènes NRPS impliqués dans la production des molécules antibiotiques chez les bactéries B-LR et 32. Afin d'identifier ces gènes, deux banques d'ADN génomiques de 960 et 1300 clones ont été construites. Par soucis de temps la banque génomique de la souche 32 n'a pas été criblée.

Une technique de criblage par PCR dégénérées sur colonies a été développée dans le but de retrouver dans la banque de B-LR, le ou les gènes impliqués dans la biosynthèse des molécules antibiotiques produites par ce micro-organisme. Grâce à ce criblage, quatre clones d'intérêts sur les 960 ont été sélectionnés puis séquencés.

L'étude *in silico* des séquences a permis d'identifier les différents modules d'un cluster NRPS qui serait à l'origine de la biosynthèse d'un variant de la colistine chez le *Paenibacillus* B-LR. Ce cluster de gènes nommé *col* est composé de 5 cadres ouverts de lecture : *colA*, *colB*, *colC*, *colD* et *colE*. Nous avons alors comparé le cluster *col* avec les clusters *pmx* de production de la polymyxine A chez *P. polymyxa* E681 (Choi *et al.*, 2009), de la polymyxine E chez *P. polymyxa* ATCC21830 (brevet US 8,329,430 de Park *et al.*, 2012), de la polymyxine B chez *P. polymyxa* PKB1 (Shaheen *et al.*, 2011) et de la polymyxine P chez *P. polymyxa* M-1 (Niu *et al.*, 2013). Ces 5 clusters montrent une forte homologie de séquence, un même nombre de gènes et une même organisation et orientation de ces gènes. Les gènes *colA/pmxA*, *colB/pmxB* et *colC/pmxC* codent pour des synthétases NRPS respectives de 4, 1 et 5 modules tandis que les gènes *colC/pmxC* et *colD/pmxD* sont des homologues de gènes codant pour des transporteurs. L'ordre des modules pour l'assemblage des acides aminés lors de la synthèse des polymyxines est *colE/pmxE-colA/pmxA-colB/pmxB*.

Les prédictions *in silico* prédisent l'incorporation des mêmes aa que ceux retrouvés par spectrométrie de masse haute résolution dans la colistine. La structure prédite présente également la particularité de posséder un D-Dab en position 3 alors que les colistines intègrent normalement un L-Dab. Par conséquent, en se basant sur ces prédictions les molécules produites par B-LR pourraient représenter de nouvelles formes de colistine.

En raison de l'importance pharmaceutique des colistines ces résultats font l'objet d'une demande de brevet déposée le 27 janvier 2014 sous le n° 1450641 aux noms du CNRS et de l'Université de La Rochelle.

En raison de problème méthodologiques liés à la culture et à la transformation du *Paenibacillus* B-LR, et malgré de nombreux efforts, nous n'avons pas été en mesure de mettre au point un mutant incapable de produire de la colistine. Afin de valider le rôle du cluster *col* dans la biosynthèse de la colistine, une démarche d'expression hétérologue chez *Bacillus subtilis* est en cours. En parallèle une étude est menée afin de vérifier quels sont les monomères activés par les différents domaines d'adénylation de la synthétase *colA* du cluster *col*. Cette étude consiste à vérifier la spécificité des substrats incorporés par les domaines d'adénylation A₆, A₇ et A₈ de la synthétase *colA*. Les domaines A₆ et A₇ ont été sélectionnés car les acides aminés qu'ils activent (D-Leucine et L-Leucine respectivement) sont spécifiques des colistines.

Actuellement la production de colistine peut être effectuée soit par synthèse chimique, voie récente mais coûteuse ; soit par fermentation industrielle, voie classique, peu coûteuse, utilisant des cultures de *P. polymyxa*. Cette dernière voie a longtemps été limitée dans son développement par un manque d'information sur les gènes impliqués dans la production de ces molécules. Contrairement aux molécules obtenues par synthèse chimique, les molécules produites par fermentation sont très cationiques ce qui les rendraient plus cytotoxique. C'est pourquoi de nouvelles techniques de production sont envisagées. Des travaux sont ainsi menés pour identifier et cloner les gènes codant pour les polymyxines synthétases dont la colistine. Le développement d'analogues de colistine avec une toxicité réduite a été limité en raison de la complexité de ces structures et du manque d'information sur les gènes de biosynthèse de ces molécules.

A terme, l'identification des gènes impliqués dans la synthèse de la colistine pourrait permettre, via des procédés de génie génétique, de mieux contrôler la production de ces molécules, voire de produire des molécules à haute pureté ; mais aussi de créer des molécules dérivées, présentant moins d'effets secondaires et/ou présentant une meilleure activité antimicrobienne. Pour ce faire, il pourrait être envisagé par exemple de substituer les domaines d'adénylation spécifiques des acides aminés Dab par des domaines intégrant des aa homologues mais non cationiques.

Une autre voie envisageable pourrait se situer à l'interface entre la synthèse chimique et la production biotechnologique. Elle pourrait associer les avantages de la synthèse chimique

(production de composés à toxicités réduites) aux avantages des fermentations (production à bas coût, cyclisation sous contrôle enzymatique ...).

- **Recherche de la présence de nouvelles NRPS chez des microorganismes issus d'une station d'étude environnementale du laboratoire.**

Cette recherche a été effectuée sur des micro-organismes peu étudiés dans ce contexte. Elle a été fructueuse puisque nous avons pu détecter la présence de gènes codant des NRPS dans 30 souches sur 100 testées. Après séquençage nous avons pu mettre en évidence 3 domaines d'adénylation présentant une signature nouvelle. Nous avons également sélectionné par ce crible un micro-organisme dont le surnageant a fortement inhibé la croissance de certains coques à Gram positif. Cette étude a été acceptée pour publication dans FEMS Microbiology Letters. Ce travail préliminaire pourrait permettre d'envisager une étude métagénomique de cette niche écologique.

Références

Bibliographiques

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H.** 2008. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3): 305-325.
- Adams, M. D., Nickel, G. C., Bajaksouzian, S., Lavender, H., Murthy, A. R., Jacobs, M. R., & Bonomo, R. A.** 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(9): 3628-3634.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6): 1037-1050.
- Antoniadou, A., Kontopidou, F., Poulakou, G., Koratzanis, E., Galani, I., Papadomichelakis, E., Kopterides, P., Souli, M., Armaganidis, A., & Giamarellou, H.** 2007. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*, 59(4): 786-790.
- Arroyo, L. A., Herrera, C. M., Fernandez, L., Hankins, J. V., Trent, M. S., & Hancock, R. E.** 2011. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(8): 3743-3751.
- Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D.** 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 64(3-4): 253-260.
- Bachmann, B. O., & Ravel, J.** 2009. Methods for In Silico Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data., *Methods in Enzymology*, Vol. 458: 181-217.
- Balibar, C. J., Vaillancourt, F. H., & Walsh, C. T.** 2005. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol*, 12(11): 1189-1200.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J. M.** 1998. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest*, 102(5): 874-880.
- Barnett, M., Bushby, S. R., & Wilkinson, S.** 1964. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol Chemother*, 23: 552-574.
- Bauldoff, G. S., Nunley, D. R., Manzetti, J. D., Dauber, J. H., & Keenan, R. J.** 1997. Use of aerosolized colistin sodium in cystic fibrosis patients awaiting lung transplantation. *Transplantation*, 64(5): 748-752.
- Beatty, P. H., & Jensen, S. E.** 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Can J Microbiol*, 48(2): 159-169.

- Beceiro, A., Llobet, E., Aranda, J., Bengoechea, J. A., Doumith, M., Hornsey, M., Dhanji, H., Chart, H., Bou, G., Livermore, D. M., & Woodford, N.** 2011. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7): 3370-3379.
- Becq, F.** 2003. CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in CF. *Archives de Pédiatrie*, 10(SUPPL. 2): 325s-332s.
- Belshaw, P. J., Walsh, C. T., & Stachelhaus, T.** 1999. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science*, 284(5413): 486-489.
- Bellon, G.** 2005. Centres de ressources et de compétence de la mucoviscidose et réseaux de soins : le rôle des différents acteurs.
- Benedict, R. G., & Stodola, F. H.** 1949. Effect of various factors on the production of polymyxin. *Ann N Y Acad Sci*, 51(Art. 5): 866-874.
- Bergogne-Bérézin, E.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa*. Son rôle dans les infections respiratoires : Phase 5 éditions médicales.
- Bergen, P. J., Landersdorfer, C. B., Zhang, J., Zhao, M., Lee, H. J., Nation, R. L., & Li, J.** 2012. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74(3): 213-223.
- Bergen, P. J., Li, J., Rayner, C. R., & Nation, R. L.** 2006. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(6): 1953-1958.
- Beveridge, E. G., & Martin, A. J.** 1967. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol Chemother*, 29(2): 125-135.
- Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M.** 2012. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10(8): 917-934.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards Jr, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J.** 2009. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1): 1-12.
- Breazeale, S. D., Ribeiro, A. A., McClerren, A. L., & Raetz, C. R.** 2005. A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *J Biol Chem*, 280(14): 14154-14167.
- Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T., & Stubbs, M. T.** 2002. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure*, 10(3): 301-310.

- Budzikiewicz, H.** 2004. Siderophores of the *Pseudomonadaceae* sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the chemistry of organic natural products. Progres dans la chimie des substances organiques naturelles, 87: 81-237.
- Byford, M. F., Baldwin, J. E., Shiau, C. Y., & Schofield, C. J.** 1997. The mechanism of ACV synthetase. *Chem Rev*, 97(7): 2631-2649.
- Caboche, S., Leclère, V., Pupin, M., Kucherov, G., & Jacques, P.** 2010. Diversity of monomers in nonribosomal peptides: Towards the prediction of origin and biological activity. *J Bacteriol*, 192(19): 5143-5150.
- Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P., & Kucherov, G.** 2008. NORINE: A database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res*, 36(SUPPL. 1): D326-D331.
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompарт, C. M., Alberti, S., & Bengoechea, J. A.** 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 72(12): 7107-7114.
- Challis, G. L., & Naismith, J. H.** 2004. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, 14(6): 748-756.
- Challis, G. L., Ravel, J., & Townsend, C. A.** 2000. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemistry and Biology*, 7(3): 211-224.
- Chevrot, R., Didelot, S., Van den Bossche, L., Tambadou, F., Caradec, T., Marchand, P., Izquierdo, E., Sopéna, V., Caillon, J., Barthélémy, C., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., & Rosenfeld, E.** 2013. A Novel Depsipeptide Produced by *Paenibacillus alvei* 32 Isolated from a Cystic fibrosis Patient. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(1): 18-25.
- Choi, S. K., Park, S. Y., Kim, R., Kim, S. B., Lee, C. H., Kim, J. F., & Park, S. H.** 2009. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 191(10): 3350-3358.
- Choi, S. K., Park, S. Y., Kim, R., Lee, C. H., Kim, J. F., & Park, S. H.** 2007. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. *Biochem Biophys Res Commun*, 365(1): 89-95.
- Clausell, A., Garcia-Subirats, M., Pujol, M., Busquets, M. A., Rabanal, F., & Cajal, Y.** 2007. Gram-negative outer and inner membrane models: Insertion of cyclic cationic lipopeptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(3): 551-563.
- Clements, A., Tull, D., Jenney, A. W., Farn, J. L., Kim, S. H., Bishop, R. E., McPhee, J. B., Hancock, R. E., Hartland, E. L., Pearse, M. J., Wijburg, O. L., Jackson, D. C., McConville, M. J., & Strugnell, R. A.** 2007. Secondary acylation of Klebsiella

- pneumoniae lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem*, 282(21): 15569-15577.
- Clugston, S. L., Sieber, S. A., Marahiel, M. A., & Walsh, C. T.** 2003. Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: the C5 domain of tyrocidine synthetase is a (D)C(L) catalyst. *Biochemistry*, 42(41): 12095-12104.
- Cochrane, S. A., & Vederas, J. C.** 2014. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews*.
- Conférence de consensus.** 2002. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A., & Brick, P.** 1997. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO Journal*, 16(14): 4174-4183.
- Conway, S. P., Brownlee, K. G., Denton, M., & Peckham, D. G.** 2003. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis organisms in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Medicine*, 2(4): 321-332.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., & van Sinderen, D.** 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 8(5): 821-831.
- DeCrescenzo Henriksen, E., Phillips, D. R., & Peterson, J. B. D.** 2007. Polymyxin E production by *P. amylolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5): 491-496.
- Deng, Y., Lu, Z., Bi, H., Lu, F., Zhang, C., & Bie, X.** 2011. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. *Peptides*, 32(9): 1917-1923.
- Dieckmann, R., Lee, Y. O., van Liempt, H., von Döhren, H., & Kleinkauf, H.** 1995. Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Letters*, 357(2): 212-216.
- Dijksterhuis, J., Sanders, M., Gorris, L. G. M., & Smid, E. J.** 1999. Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1): 13-21.
- Donadio, S., Monciardini, P., & Sosio, M.** 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: The emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep*, 24(5): 1073-1079.
- Drenkard, E., & Ausubel, F. M.** 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416(6882): 740-743.
- Dreyfuss, M., Härri, E., Hofmann, H., Kobel, H., Pache, W., & Tschertter, H.** 1976. Cyclosporin A and C - New metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *European Journal Of Applied Microbiology*, 3(2): 125-133.

- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 564-582.
- Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J., & Shen, B.** 2000. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry and Biology*, 7(8): 623-642.
- Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Muller, R., & Marahiel, M. A.** 2004. Rational design of a bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chem Biol*, 11(2): 261-271.
- Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., & Vater, J.** 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23): 13294-13299.
- Ehmann, D. E., Trauger, J. W., Stachelhaus, T., & Walsh, C. T.** 2000. Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 7(10): 765-772.
- Eliasson Lantz, A., Jorgensen, P., Poulsen, E., Lindemann, C., & Olsson, L.** 2006. Determination of cell mass and polymyxin using multi-wavelength fluorescence. *J Biotechnol*, 121(4): 544-554.
- Elverdam, I., Larsen, P., & Lund, E.** 1981. Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B and E by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 218: 653-661.
- Ernst, R. K., Adams, K. N., Moskowitz, S. M., Kraig, G. M., Kawasaki, K., Stead, C. M., Stephen Trent, M., & Miller, S. I.** 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: Selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J Bacteriol*, 188(1): 191-201.
- Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M., & Miller, S. I.** 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 286(5444): 1561-1565.
- Evans, M. E., Feola, D. J., & Rapp, R. P.** 1999. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother*, 33(9): 960-967.
- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K.** 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 40(9): 1333-1341.

- Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., Tsiodras, S., & Michalopoulos, A. 2006.** The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. *Clin Med Res*, 4(2): 138-146.
- Falagas, M. E., & Michalopoulos, A. 2006.** Polymyxins: old antibiotics are back. *Lancet*, 367(9511): 633-634.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Ioannidou, E., Alexiou, V. G., Matthaiou, D. K., Karageorgopoulos, D. E., Kapaskelis, A., Nikita, D., & Michalopoulos, A. 2010a.** Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(2): 194-199.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., & Matthaiou, D. K. 2010b.** Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, 13(4–5): 132-138.
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K., Vartzili, S., Nikita, D., & Michalopoulos, A. 2008.** Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. *Int J Antimicrob Agents*, 32(5): 450-454.
- Farrell, P. M. 2008.** The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(5): 450-453.
- Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., & Thomas, M. G. 2007.** Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2): 191-211.
- Fernandez, L., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. 2012.** The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(12): 6212-6222.
- Finking, R., & Marahiel, M. A. 2004.** Biosynthesis of nonribosomal peptides1. *Annu Rev Microbiol*, 58: 453-488.
- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. 2006.** Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic machinery, and mechanisms. *Chem Rev*, 106(8): 3468-3496.
- Fortes, T. O., Alviano, D. S., Tupinambá, G., Padrón, T. S., Antonioli, A., Alviano, C. S., & Seldin, L. 2008.** Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*. *Microbiological Research*, 163(2): 200-207.
- Fothergill, J. L., Panagea, S., Hart, C. A., Walshaw, M. J., Pitt, T. L., & Winstanley, C. 2007.** Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiol*, 7.

- Foucaud, P., de Truchis, A., Tassin, E., Allouch, P., & Pangon, B.** 2006. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: non-antibiotic strategy. *Arch Pediatr*, 13 Suppl 1: S44-47.
- Frederiksen, B., Koch, C., & Høiby, N.** 1997. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 23(5): 330-335.
- Gehring, A. M., Mori, I., Perry, R. D., & Walsh, C. T.** 1998. The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*, 37(33): 11637-11650.
- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H., & Reichenbach, H.** 1996. Epothilons A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 49(6): 560-563.
- Gibson, R. L., Burns, J. L., & Ramsey, B. W.** 2003. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(8): 918-951.
- Giske, C. G., Monnet, D. L., Cars, O., & Carmeli, Y.** 2008. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(3): 813-821.
- Govaerts, C., Orwa, J., Van Schepdael, A., Roets, E., & Hoogmartens, J.** 2002. Liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for the characterization of polypeptide antibiotics of the colistin series in commercial samples. *Journal of Chromatography A*, 976(1-2): 65-78.
- Govaerts, C., Orwa, J., Van Schepdael, A., Roets, E., & Hoogmartens, J.** 2002a. Characterization of polypeptide antibiotics of the polymyxin series by liquid chromatography electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Peptide Science*, 8(2): 45-55.
- Govaerts, C., Orwa, J., Van Schepdael, A., Roets, E., & Hoogmartens, J.** 2002b. Liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for the characterization of polypeptide antibiotics of the colistin series in commercial samples. *Journal of Chromatography A*, 976(1-2): 65-78.
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., & Peypoux, F.** 2001. Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 90(3): 199-210.
- Grünewald, J., & Marahiel, M. A.** 2006. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1): 121-146.

- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C., & Grandi, G.** 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49): 32857-32863.
- Guillemette, T., Sellam, A., & Simoneau, P.** 2004. Analysis of a nonribosomal peptide synthetase gene from *Alternaria brassicae* and flanking genomic sequences. *Current Genetics*, 45(4): 214-224.
- Gunn, J. S.** 2008. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*, 16(6): 284-290.
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., & Miller, S. I.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol*, 27(6): 1171-1182.
- Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K., & Miller, S. I.** 2000. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun*, 68(11): 6139-6146.
- Hacker, C., Glinski, M., Hornbogen, T., Doller, A., & Zocher, R.** 2000. Mutational analysis of the N-methyltransferase domain of the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40): 30826-30832.
- Hamada, T., Matsunaga, S., Yano, G., & Fusetani, N.** 2005. Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. *Journal of the American Chemical Society*, 127(1): 110-118.
- Han, J. W., Kim, E. Y., Lee, J. M., Kim, Y. S., Bang, E., & Kim, B. S.** 2012. Site-directed modification of the adenylation domain of the fusaricidin nonribosomal peptide synthetase for enhanced production of fusaricidin analogs. *Biotechnol Lett*, 34(7): 1327-1334.
- Hancock, R. E.** 1997. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J Med Microbiol*, 46(1): 1-3.
- Hancock, R. E., & Chapple, D. S.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6): 1317-1323.
- Hancock, R. E., & Lehrer, R.** 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*, 16(2): 82-88.
- Haute Autorité de Santé** : http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_724393/fr/colimycine.
- He, Z., Kisla, D., Zhang, L., Yuan, C., Green-Church, K. B., & Yousef, A. E.** 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol*, 73(1): 168-178.
- Helander, I. M., Kato, Y., Kilpelainen, I., Kostianen, R., Lindner, B., Nummila, K., Sugiyama, T., & Yokochi, T.** 1996. Characterization of lipopolysaccharides of

- polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem*, 237(1): 272-278.
- Helander, I. M., Kilpelainen, I., & Vaara, M.** 1994. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR study. *Mol Microbiol*, 11(3): 481-487.
- Henry, R., Vithanage, N., Harrison, P., Seemann, T., Coutts, S., Moffatt, J. H., Nation, R. L., Li, J., Harper, M., Adler, B., & Boyce, J. D.** 2012. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-beta-1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(1): 59-69.
- Hermesen, E. D., Sullivan, C. J., & Rotschafer, J. C.** 2003. Polymyxins: Pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 17(3): 545-562.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S.** 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14(4): 378-379.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Leenders, F., Hitzeroth, G., & Vater, J.** 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol Genet Genomics*, 272(4): 363-378.
- Hoiby, N.** 2002. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: Current and innovative approaches to potential therapies. *Journal of Cystic Fibrosis*, 1(4): 249-254.
- Hoiby, N., Frederiksen, B., & Pressler, T.** 2005. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Cystic Fibrosis*, 4(2 SUPPL.): 49-54.
- Huang, E., Guo, Y., & Yousef, A. E.** 2014. Biosynthesis of the new broad-spectrum lipopeptide antibiotic paenibacterin in *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE. *Research in Microbiology*, 165(3): 243-251.
- Huang, E., & Yousef, A. E.** 2012. Draft genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF, which coproduces a lantibiotic, paenibacillin, and polymyxin E1. *J Bacteriol*, 194(17): 4739-4740.
- Huang, Z., Hu, Y., Shou, L., & Song, M.** 2013. Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus ehimensis* B7. *BMC Microbiol*, 13(1).
- Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Harada, K. I., & Suzuki, M.** 1992. Structural characterization of bacitracin components by Frit-fast atom bombardment (FAB) liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). *J Antibiot (Tokyo)*, 45(8): 1325-1334.
- Ito, M., & Koyama, Y.** 1972a. Jolipeptin, a new peptide antibiotic. II. The mode of action of jolipeptin. *Journal of Antibiotics*, 25(5): 309-314.

- Ito, M., & Koyama, Y.** 1972b. Localization of jolipeptin and colistin in their producing strain, *Bacillus polymyxa* var. *colistinus* Koyama. *Journal of Antibiotics*, 25(2): 147-148.
- Jensen, T., Pedersen, S. S., Garne, S., Heilmann, C., Hoiby, N., & Koch, C.** 1987. Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 19(6): 831-838.
- Jiang, S. S., Lin, T. Y., Wang, W. B., Liu, M. C., Hsueh, P. R., & Liaw, S. J.** 2010. Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(5): 2000-2009.
- Kajimura, Y., & Kaneda, M.** 1996. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 49(2): 129-135.
- Kajimura, Y., & Kaneda, M.** 1997. Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: Isolation, structure elucidation and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 50(3): 220-228.
- Kalinovskay, N. I., Romanenko, L. A., Kalinovskiy, A. I., Dmitrenok, P. S., & Dyshlovoy, S. A.** 2013. A new antimicrobial and anticancer peptide producing by the marine deep sediment strain "*Paenibacillus profundus*" sp. nov. Sl 79. *Natural Product Communications*, 8(3): 381-384.
- Kato, A., Latifi, T., & Groisman, E. A.** 2003. Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8): 4706-4711.
- Katz, E., & Demain, A. L.** 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews*, 41(2): 449-474.
- Keating, T. A., Ehmann, D. E., Kohli, R. M., Marshall, C. G., Trauger, J. W., & Walsh, C. T.** 2001. Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis. *ChemBioChem*, 2(2): 99-107.
- Keating, T. A., Marshall, C. G., & Walsh, C. T.** 2000. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry*, 39(50): 15522-15530.
- Kim, J. F., Jeong, H., Park, S. Y., Kim, S. B., Park, Y. K., Choi, S. K., Ryu, C. M., Hur, C. G., Ghim, S. Y., Oh, T. K., Kim, J. J., Park, C. S., & Park, S. H.** 2010. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J Bacteriol*, 192(22): 6103-6104.
- Kim, S. B., & Timmusk, S.** 2013. A Simplified Method for Gene Knockout and Direct Screening of Recombinant Clones for Application in *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One*, 8(6).

- Kim, U. J., Shizuya, H., de Jong, P. J., Birren, B., & Simon, M. I.** 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res*, 20(5): 1083-1085.
- Kline, T., Trent, M. S., Stead, C. M., Lee, M. S., Sousa, M. C., Felise, H. B., Nguyen, H. V., & Miller, S. I.** 2008. Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(4): 1507-1510.
- Kohli, R. M., Trauger, J. W., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., & Walsh, C. T.** 2001. Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40(24): 7099-7108.
- Komura, S., & Kurahashi, K.** 1980. Biosynthesis of polymyxin E by a cell-free enzyme system. II. Synthesis of enzyme-bound octanoyldiaminobutyric acid. *Journal of Biochemistry*, 88(1): 285-288.
- Komura, S., & Kurahashi, K.** 1985. Biosynthesis of polymyxin E by a cell-free enzyme system. IV. Acylation of enzyme-bound L-2,4-diaminobutyric acid. *Journal of Biochemistry*, 97(5): 1409-1417.
- Konz, D., Doekel, S., & Marahiel, M. A.** 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J Bacteriol*, 181(1): 133-140.
- Kuroda, J., Fukai, T., Konishi, M., Uno, J., Kurusu, K., and Nomura, T.** 2000. LI-F antibiotics, a family of antifungal cyclic depsipeptides produced by *Bacillus polymyxa* L-1129. *Heterocycles* 53, 1533–1549.
- Kurusu, K., Ohba, K., Arai, T., & Fukushima, K.** 1987. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07, and F08, produced by *Bacillus polymyxa*. I. Isolation and characterization. *Journal of Antibiotics*, 40(11): 1506-1514.
- Lam, P. K. S., Yang, M., & Lam, M. H. W.** 2000. Toxicology and evaluation of microcystins. *Therapeutic Drug Monitoring*, 22(1): 69-72.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J.** 2008. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*, 21(3): 449-465.
- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J., & Mavrodi, D.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and Immunity*, 72(7): 4275-4278.
- Lautru, S., & Challis, G. L.** 2004. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology*, 150(6): 1629-1636.
- Levin, A. S., Barone, A. A., Penco, J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A., Manrique, E. I., & Costa, S. F.** 1999. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*, 28(5): 1008-1011.

- Li, J., Beatty, P. K., Shah, S., & Jensen, S. E. 2007a. Use of PCR-targeted mutagenesis to disrupt production of fusaricidin-type antifungal antibiotics in *Paenibacillus polymyxa*. *Appl Environ Microbiol*, 73(11): 3480-3489.
- Li, J., & Jensen, S. E. 2007. Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 Involves Direct Activation of a d-Amino Acid. *Chemistry and Biology*, 15(2): 118-127.
- Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. 2003a. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4): 1364-1370.
- Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Smeaton, T. C., & Coulthard, K. 2003b. Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(5): 1766-1770.
- Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Smeaton, T. C., & Coulthard, K. 2004. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J Antimicrob Chemother*, 53(5): 837-840.
- Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 25(1): 11-25.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infectious Diseases*, 6(9): 589-601.
- Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Deans, R., Boots, R., Widdecombe, N., Douglas, A., & Lipman, J. 2005b. Pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and colistin in a critically ill patient receiving continuous venovenous hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11): 4814-4815.
- Li, S., Zhang, R., Wang, Y., Zhang, N., Shao, J., Qiu, M., Shen, B., Yin, X., & Shen, Q. 2013. Promoter analysis and transcription regulation of fus gene cluster responsible for fusaricidin synthesis of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(21): 9479-9489.
- Liang, X. Y., Huang, H. C., Yanke, L. J., & Kozub, G. C. 1996. Control of damping-off of safflower by bacterial seed treatment. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(1): 43-49.
- Lin, T. P., Chen, C. L., Chang, L. K., Tschen, J. S. M., & Liu, S. T. 1999. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, fenC, from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 181(16): 5060-5067.

- Linne, U., Doekel, S., & Marahiel, M. A.** 2001. Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40(51): 15824-15834.
- Linne, U., & Marahiel, M. A.** 2000. Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: Role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*, 39(34): 10439-10447.
- Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., & Roskoski Jr, R.** 1971. Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 35: 1-34.
- Littlewood, J. M., Koch, C., Lambert, P. A., Høiby, N., Elborn, J. S., Conway, S. P., Dinwiddie, R., & Duncan-Skingle, F.** 2000. A ten year review of Colomycin. *Respiratory Medicine*, 94(7): 632-640.
- Littlewood, J. M., Miller, M. G., Ghoneim, A. T., & Ramsden, C. H.** 1985. Nebulised colomycin for early pseudomonas colonisation in cystic fibrosis. *Lancet*, 1(8433): 865.
- Livermore, D. M.** 2007. Introduction: the challenge of multiresistance. *Int J Antimicrob Agents*, 29 Suppl 3: S1-7.
- Llobet, E., Tomas, J. M., & Bengoechea, J. A.** 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, 154(Pt 12): 3877-3886.
- Lorentz, R. H., Ártico, S., Da Silveira, A. B., Einsfeld, A., & Corção, G.** 2006. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. *Letters in Applied Microbiology*, 43(5): 541-547.
- Loutet, S. A., Bartholdson, S. J., Govan, J. R., Campopiano, D. J., & Valvano, M. A.** 2009. Contributions of two UDP-glucose dehydrogenases to viability and polymyxin B resistance of *Burkholderia cenocepacia*. *Microbiology*, 155(Pt 6): 2029-2039.
- Luo, L., Kohli, R. M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M. A., & Walsh, C. T.** 2002. Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: Kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry*, 41(29): 9184-9196.
- Ma, M., Wang, C., Ding, Y., Li, L., Shen, D., Jiang, X., Guan, D., Cao, F., Chen, H., Feng, R., Wang, X., Ge, Y., Yao, L., Bing, X., Yang, X., Li, J., & Du, B.** 2010. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a strain of plant growth-promoting Rhizobacterium with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Bacteriol*, 193(1): 311-312.
- Macfarlane, E. L., Kwasnicka, A., Ochs, M. M., & Hancock, R. E.** 1999. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol*, 34(2): 305-316.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S. M., & Turner, G.** 2006. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: Identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *ChemBioChem*, 7(7): 1062-1069.

- Malott, R. J., Steen-Kinnaird, B. R., Lee, T. D., & Speert, D. P.** 2012. Identification of hopanoid biosynthesis genes involved in polymyxin resistance in *Burkholderia multivorans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(1): 464-471.
- Malott, R. J., Wu, C. H., Lee, T. D., Hird, T. J., Dalleska, N. F., Zlosnik, J. E., Newman, D. K., & Speert, D. P.** 2014. Fosmidomycin decreases membrane hopanoids and potentiates the effects of colistin on *Burkholderia multivorans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Marahiel, M. A., Kessler, N., & Linne, U.** 2003. Demain, des antibiotiques à façon ?
- Marahiel, M. A., & Essen, L. O.** 2009. Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods Enzymol*, 458: 337-351.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., & Mootz, H. D.** 1997. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev*, 97(7): 2651-2674.
- Mariani-Kurkdjian, P., & Bingen, E.** 2003. [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr*, 10 Suppl 2: 342s-346s.
- Markou, N., Apostolakis, H., Koumoudiou, C., Athanasiou, M., Koutsoukou, A., Alamanos, I., & Gregorakos, L.** 2003. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative *Bacilli* in critically ill patients. *Crit Care*, 7(5): R78-83.
- Martin, N. I., Hu, H., Moake, M. M., Churey, J. J., Whittal, R., Worobo, R. W., & Vederas, J. C.** 2003. Isolation, structural characterization, and properties of mactacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. *J Biol Chem*, 278(15): 13124-13132.
- Martis, N., Leroy, S., & Blanc, V.** 2014. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *J Infect*, 69(1): 1-12.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T.** 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(12): 3322-3327.
- Mavingui, P., & Heulin, T.** 1994. In vitro chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(6): 801-803.
- May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A., & Stubbs, M. T.** 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19): 12120-12125.

- McCormick, M. H., McGuire, J. M., Pittenger, G. E., Pittenger, R. C., & Stark, W. M.** 1955. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiotics annual*, 3: 606-611.
- McPhee, J. B., Lewenza, S., & Hancock, R. E.** 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 50(1): 205-217.
- Mehta, G., Macek, M., & Mehta, A.** 2010. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *Journal of Cystic Fibrosis*, 9(SUPPL. 2): S5-S21.
- Menges, R., Muth, G., Wohlleben, W., & Stegmann, E.** 2007. The ABC transporter Tba of *Amycolatopsis balhimycina* is required for efficient export of the glycopeptide antibiotic balhimycin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77(1): 125-134.
- Miao, V., Brost, R., Chapple, J., She, K., Coëffet-Le Gal, M. F., & Baltz, R. H.** 2006. The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(2): 129-140.
- Miao, V., Coëffet-LeGal, M. F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C. J., Wrigley, S. K., & Baltz, R. H.** 2005. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: Cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, 151(5): 1507-1523.
- Michalopoulos, A. S., & Karatza, D. C.** 2010. Multidrug-resistant Gram-negative infections: The use of colistin. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(9): 1009-1017.
- Mingeot-Leclercq, M.-P., Tulkens, P. M., Denamur, S., Vaara, T., & Vaara, M.** 2012. Novel polymyxin derivatives are less cytotoxic than polymyxin B to renal proximal tubular cells. *Peptides*, 35(2): 248-252.
- Mitaku, S., & Hirokawa, T.** 1999. Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: Hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Engineering*, 12(11): 953-957.
- Mitaku, S., Hirokawa, T., & Tsuji, T.** 2002. Amphiphilicity index index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics*, 18(4): 608-616.
- Moffatt, J. H., Harper, M., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., & Boyce, J. D.** 2011. Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6): 3022-3024.
- Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St Michael, F., Cox, A. D., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., & Boyce, J. D.** 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(12): 4971-4977.

- Mootz, H. D., & Marahiel, M. A.** 1997. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1(4): 543-551.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D., & Marahiel, M. A.** 2000. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11): 5848-5853.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D., & Marahiel, M. A.** 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 3(6): 490-504.
- Moyne, A. L., Cleveland, T. E., & Tuzun, S.** 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett*, 234(1): 43-49.
- Muhlebach, M. S., Miller, M. B., Moore, C., Wedd, J. P., Drake, A. F., & Leigh, M. W.** 2006. Are lower airway or throat cultures predictive of sinus bacteriology in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*, 41(5): 445-451.
- Munck, A., Sahler, C., Briard, M., Vidailhet, M., & Farriaux, J. P.** 2005. Cystic fibrosis: The French neonatal screening organization, preliminary results. *Archives de Pédiatrie*, 12(6): 646-649.
- Murray, K. D., & Aronstein, K. A.** 2008. Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2): 325-328.
- Nagao, J. i., Asaduzzaman, S. M., Aso, Y., Okuda, K. i., Nakayama, J., & Sonomoto, K.** 2006. Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(3): 139-149.
- Naghmouchi, K., Hammami, R., Fliss, I., Teather, R., Baah, J., & Drider, D.** 2011. Colistin A and colistin B among inhibitory substances of *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1. *Archives of Microbiology*: 1-8.
- Nakajima, N., Chihara, S., & Koyama, Y.** 1972. A new antibiotic, gatavalin. I. Isolation and characterization. *Journal of Antibiotics*, 25(4): 243-247.
- Newton, B. A.** 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological Reviews*, 20(1): 14-27.
- Niu, B., Vater, J., Rueckert, C., Blom, J., Lehmann, M., Ru, J. J., Chen, X. H., Wang, Q., & Borriss, R.** 2013. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1. *BMC Microbiol*, 13(1): 137.
- Orwa, J. A., Govaerts, C., Busson, R., Roets, E., Van Schepdael, A., & Hoogmartens, J.** 2001. Isolation and structural characterization of colistin components. *Journal of Antibiotics*, 54(7): 595-599.
- Orwa, J. A., Govaerts, C., Gevers, K., Roets, E., Van Schepdael, A., & Hoogmartens, J.** 2002. Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using

- liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1-2): 203-212.
- Orwa, J. A., Van Gerven, A., Roets, E., & Hoogmartens, J.** 2000a. Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of Colistin sulphate. *Chromatographia*, 51(7-8): 433-436.
- Orwa, J. A., Van Gerven, A., Roets, E., & Hoogmartens, J.** 2000b. Liquid chromatography of polymyxin B sulphate. *Journal of Chromatography A*, 870(1-2): 237-243.
- Ouderkirk, J. P., Nord, J. A., Turett, G. S., & Kislak, J. W.** 2003. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8): 2659-2662.
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K., & Tolker-Nielsen, T.** 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol*, 68(1): 223-240.
- Park, S. H., Kim, J. F., Lee, C. H., Choi, S. K., Jeong, H., Kim, S. B., Park, Y. K., Kim, R., Ryu, C. M., & Park, S. Y.** 2012a. Polymyxin synthetase and gene cluster thereof: US Patent 8,329,430: Google Patents.
- Park, S. Y., Choi, S. K., Kim, J., Oh, T. K., & Park, S. H.** 2012b. Efficient production of polymyxin in the surrogate host *Bacillus subtilis* by introducing a foreign ectB gene and disrupting the abrB gene. *Appl Environ Microbiol*, 78(12): 4194-4199.
- Parker, W. L., & Rathnum, M. L.** 1975. EM49, a new peptide antibiotic IV. The structure of EM49. *J Antibiot (Tokyo)*, 28(5): 379-389.
- Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., & Pompliano, D. L.** 2007. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 6(1): 29-40.
- Pedersen, M. F., Pedersen, J. F., & Adsen, P. O.** 1971. A clinical and experimental comparative study of sodium colistimethate and polymyxin B sulfate. *Invest Urol*, 9(3): 234-237.
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A.** 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(10): 3471-3484.
- Perez, J. C., & Groisman, E. A.** 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 63(1): 283-293.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J.** 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(5): 553-563.
- Pichard, B., Larue, J. P., & Thouvenot, D.** 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol Lett*, 133(3): 215-218.

- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. 1998. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 27(1): 9-13.
- Price, N. P., Rooney, A. P., Swezey, J. L., Perry, E., & Cohan, F. M. 2007. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiol Lett*, 271(1): 83-89.
- Qian, C. D., Wu, X. C., Teng, Y., Zhao, W. P., Li, O., Fang, S. G., Huang, Z. H., & Gao, H. C. 2012. Battacin (octapeptin B5), a new cyclic lipopeptide antibiotic from *Paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(3): 1458-1465.
- Quadri, L. E. N., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P., & Walsh, C. T. 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, 37(6): 1585-1595.
- Rachoin, J. S., Schorr, C. A., & Dellinger, R. P. 2010. Targeting endotoxin in the treatment of sepsis. *Subcell Biochem*, 53: 323-338.
- Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, 76: 295-329.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71: 635-700.
- Ramsey, B. W. 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 335(3): 179-188.
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., & Huson, D. H. 2007. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 7.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., & Huson, D. H. 2005. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res*, 33(18): 5799-5808.
- Raza, W., Hongsheng, W., & Qirong, S. 2010b. Use of response surface methodology to evaluate the effect of metal ions (Ca²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺) on production of antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa*. *Bioresour Technol*, 101(6): 1904-1912.
- Raza, W., Yang, X., Wu, H., Huang, Q., Xu, Y., & Shen, Q. 2010a. Evaluation of metal ions (Zn²⁺, Fe³⁺ and Mg²⁺) effect on the production of fusaricidin-type antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresour Technol*, 101(23): 9264-9271.
- Registre français de la mucoviscidose, bilan des données 2012. Disponible sur : http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/pdf/registre_francais_de_la_mucoviscidose_2012.
- Reshetnikov, A. S., Khmelenina, V. N., Mustakhimov, II, Kalyuzhnaya, M., Lidstrom, M., & Trotsenko, Y. A. 2011. Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis

- genes in aerobic, moderately *Halophilic methylotrophic* bacteria. *Extremophiles*, 15(6): 653-663.
- Roongsawang, N., Hase, K. I., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S.** 2003. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chemistry and Biology*, 10(9): 869-880.
- Roongsawang, N., Siew, P. L., Washio, K., Takano, K., Kanaya, S., & Morikawa, M.** 2005. Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. *FEMS Microbiol Lett*, 252(1): 143-151.
- Rosado, A., Duarte, G. F., & Seldin, L.** 1994. Optimization of electroporation procedure to transform *B. polymyxa* SCE2 and other nitrogen-fixing *Bacillus*. *Journal of Microbiological Methods*, 19(1): 1-11.
- Rosado, A. S., & Seldin, L.** 1993. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 9(5): 521-528.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R., & Sivonen, K.** 2000. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol*, 37(1): 156-167.
- Rowe, S. M., Miller, S., & Sorscher, E. J.** 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 352(19): 1992-2001.
- Roy, R. S., Gehring, A. M., Milne, J. C., Belshaw, P. J., & Walsh, C. T.** 1999. Thiazole and oxazole peptides: Biosynthesis and molecular machinery. *Nat Prod Rep*, 16(2): 249-263.
- Sahm, H., Rohmer, M., Bringer-Meyer, S., Sprenger, G. A., & Welle, R.** 1993. Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 35: 247-273.
- Samel, S. A., Marahiel, M. A., & Essen, L. O.** 2008. How to tailor non-ribosomal peptide products-new clues about the structures and mechanisms of modifying enzymes. *Molecular BioSystems*, 4(5): 387-393.
- Sarkar, S., DeSantis, E. R., & Kuper, J.** 2007. Resurgence of colistin use. *Am J Health Syst Pharm*, 64(23): 2462-2466.
- Saum, S. H., & Müller, V.** 2008. Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: Ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology*, 10(3): 716-726.
- Schindler, M., & Osborn, M. J.** 1979. Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry*, 18(20): 4425-4430.
- Schneider, A., & Marahiel, M. A.** 1998. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 169(5): 404-410.

- Schneider, T. L., Shen, B., & Walsh, C. T.** 2003. Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: Thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry*, 42(32): 9722-9730.
- Schoenafinger, G., Schrecke, N., Linne, U., & Marahiel, M. A.** 2006. Formylation domain: An essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin. *Journal of the American Chemical Society*, 128(23): 7406-7407.
- Scholz-Schroeder, B. K., Hutchison, M. L., Grgurina, I., & Gross, D. C.** 2001. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(3): 336-348.
- Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A.** 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*, 20(3): 275-287.
- Selim, S., Negrel, J., Govaerts, C., Gianinazzi, S., & Van Tuinen, D.** 2005. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 71(11): 6501-6507.
- Shaheen, M., Li, J., Ross, Avena C., Vederas, John C., & Jensen, Susan E.** 2011. *Paenibacillus polymyxa* PKB1 Produces Variants of Polymyxin B-Type Antibiotics. *Chemistry & Biology*, 18(12): 1640-1648.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D. J., Chen, M., & Murrell, J. M.** 2001. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(6): 378-385.
- Sieber, S. A., & Marahiel, M. A.** 2003. Learning from Nature's Drug Factories: Nonribosomal Synthesis of Macrocyclic Peptides. *J Bacteriol*, 185(24): 7036-7043.
- Sieber, S. A., & Marahiel, M. A.** 2005. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem Rev*, 105(2): 715-738.
- Smith, D. J., Earl, A. J., & Turner, G.** 1990. The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421 073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *EMBO Journal*, 9(9): 2743-2750.
- Stachelhaus, T., Hüser, A., & Marahiel, M. A.** 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 3(11): 913-921.
- Stachelhaus, T., & Marahiel, M. A.** 1995. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett*, 125(1): 3-14.

- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendah, V., & Marahiel, M. A.** 1998. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis: Catalytic role of the condensation domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35): 22773-22781.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., & Marahiel, M. A.** 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 6(8): 493-505.
- Stachelhaus, T., Schneider, A., & Marahiel, M. A.** 1995. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science*, 269(5220): 69-72.
- Stachelhaus, T., & Walsh, C. T.** 2000. Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, 39(19): 5775-5787.
- Stansly, P. G.** 1949. The polymyxins: A review and assessment. *The American Journal of Medicine*, 7(6): 807-818.
- Storm, D. R., Rosenthal, K. S., & Swanson, P. E.** 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem*, 46: 723-763.
- Strieker, M., Tanovic, A., & Marahiel, M. A.** 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol*, 20(2): 234-240.
- Svetoch, E. A., Stern, N. J., Eruslanov, B. V., Kovalev, Y. N., Volodina, L. I., Pereygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Borzenkov, V. N., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., & Kudriavtseva, T. Y.** 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. *Journal of Food Protection*, 68(1): 11-17.
- Takeuchi, Y., Murai, A., Takahara, Y., & Kainosho, M.** 1979. The structure of permetin A, a new polypeptin type antibiotic produced by *Bacillus circulans*. *Journal of Antibiotics*, 32(2): 121-129.
- Takita, T., Muraoka, Y., Nakatani, T., Fujii, A., Iitaka, Y., & Umezawa, H.** 1978. Chemistry of bleomycin. XXI. Metal complex of bleomycin and its implication for the mechanism of bleomycin action. *Journal of Antibiotics*, 31(10): 1073-1077.
- Taylor, C. J., McGaw, J., Howden, R., Duerden, B. I., & Baxter, P. S.** 1990. Bacterial reservoirs in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood*, 65(2): 175-177.
- Terabe, S., Konaka, R., & Shoji, J. I.** 1979. Separation of polymyxins and octapeptins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 173(2): 313-320.
- Thomas, S. R., Anjana, R., Hodson, M. E., & Pitt, T. L.** 2000. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax*, 55(9): 795-797.

- Tomino, S., Yamada, M., Itoh, H., & Kurahashi, K.** 1967. Cell-free synthesis of gramicidin. *S. Biochemistry*, 6(8): 2552-2560.
- Tsuge, K., Akiyama, T., & Shoda, M.** 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol*, 183(21): 6265-6273.
- Vaara, M.** 2010c. Polymyxins and their novel derivatives. *Curr Opin Microbiol*, 13(5): 574-581.
- Vaara, M.** 2013. Novel derivatives of polymyxins. *J Antimicrob Chemother*, 68(6): 1213-1219.
- Vaara, M., Fox, J., Loidl, G., Siikanen, O., Apajalahti, J., Hansen, F., Frimodt-Moller, N., Nagai, J., Takano, M., & Vaara, T.** 2008. Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(9): 3229-3236.
- Vaara, M., Siikanen, O., Apajalahti, J., Fox, J., Frimodt-Moller, N., He, H., Poudyal, A., Li, J., Nation, R. L., & Vaara, T.** 2010b. A novel polymyxin derivative that lacks the fatty acid tail and carries only three positive charges has strong synergism with agents excluded by the intact outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(8): 3341-3346.
- Vaara, M., & Vaara, T.** 2010a. Structure-activity studies on novel polymyxin derivatives that carry only three positive charges. *Peptides*, 31(12): 2318-2321.
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J.** 2013a. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol*, 8(6): 711-724.
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J.** 2013b. Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old class of antibiotics. *Future Microbiology*, 8(6): 711-724.
- Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., & Li, J.** 2010. Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(5): 1898-1916.
- Vetting, M. W., S. De Carvalho, L. P., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L., & Blanchard, J. S.** 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1): 212-226.
- Vingsbo Lundberg, C., Vaara, T., Frimodt-Moller, N., & Vaara, M.** 2010. Novel polymyxin derivatives are effective in treating experimental *Escherichia coli* peritoneal infection in mice. *J Antimicrob Chemother*, 65(5): 981-985.
- Vogler, K., & Studer, R. O.** 1966. The chemistry of the polymyxin antibiotics. *Experientia*, 22(6): 345-354.
- Von Der Weid, I., Alviano, D. S., Santos, A. L. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S., & Seldin, L.** 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62

- against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5): 1143-1151.
- Von Döhren, H., Keller, U., Vater, J., & Zocher, R.** 1997. Multifunctional peptide synthetases. *Chem Rev*, 97(7): 2675-2705.
- Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbard, B. K., Losey, H. C., Luo, L., Marshall, C. G., Miller, D. A., & Patel, H. M.** 2001. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(5): 525-534.
- Warner, D. M., & Levy, S. B.** 2010. Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the marRAB operon. *Microbiology*, 156(Pt 2): 570-578.
- Weber, M., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Geoffroy, V., & Meyer, J. M.** 2000. The structure of a pyoverdine from *Pseudomonas* sp. CFML 96.188 and its relation to other pyoverdines with a cyclic C-terminus. *BioMetals*, 13(4): 301-309.
- Wilkinson, S., & Lowe, L. A.** 1966. Structures of the polymyxins A and the question of identity with the polymyxins M. *Nature*, 212(5059): 311.
- Wolfenden, L. L., & Schechter, M. S.** 2009. Genetic and non-genetic determinants of outcomes in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 10(1): 32-36.
- Wu, X. C., Shen, X. B., Ding, R., Qian, C. D., Fang, H. H., & Li, O.** 2010. Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69. *FEMS Microbiol Lett*, 310(1): 32-38.
- Yuan, Z., & Tam, V. H.** 2008. Polymyxin B: a new strategy for multidrug-resistant Gram-negative organisms. *Expert Opin Investig Drugs*, 17(5): 661-668.
- Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., & Nation, R. L.** 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 60(6): 1206-1215.
- Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Guo, X., & Fan, S.** 2013. Sequence characterization and computational analysis of the non-ribosomal peptide synthetases controlling biosynthesis of lipopeptides, fengycins and bacillomycin D, from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. *Biotechnol Lett*, 35(12): 2155-2163.
- Ziemert, N., & Jensen, P. R.** 2012. Phylogenetic approaches to natural product structure prediction. *Methods Enzymol*, 517: 161-182.

Annexes

Résumé

La colistine, antibiotique appartenant à la famille des polymyxines, est un polypeptide cyclique, cationique, ciblant les membranes bactériennes. Elle est produite par *Paenibacillus polymyxa* via des complexes multi-enzymatiques appelés Non-Ribosomal Peptides Synthétases (NRPS). Dans le cas de la mucoviscidose, et malgré des effets secondaires importants, la colistine est utilisée comme ultime recours pour lutter contre les bactéries Gram-négatives multirésistantes responsables d'infections pulmonaires dont *Pseudomonas aeruginosa*. Jusqu'ici les systèmes génétiques à l'origine de la production de la colistine étaient peu connus. Au cours de cette étude, nous avons caractérisé par LC-MS haute résolution des molécules antimicrobiennes, dont des colistines, produites par un nouveau *Paenibacillus*. Afin d'identifier et de cloner le cluster de gène responsable de la production de ces antibiotiques, une banque d'ADN génomique a été construite et criblée par homologie de séquence avec des systèmes de production déjà connus. Ce criblage a permis de sélectionner quatre clones d'intérêt. L'étude *in silico* de leurs séquences a permis d'identifier les différents modules d'un nouveau cluster NRPS qui serait à l'origine de la synthèse de variants de la colistine. À terme, cette découverte pourrait permettre de mieux contrôler la production de la colistine et d'obtenir des composés plus actifs et/ou présentant des effets secondaires amoindris. En parallèle à ce premier travail, nous avons également recherché la présence de nouvelles NRPS chez une centaine de micro-organismes issus d'une station d'étude environnementale du laboratoire (vasière intertidale). Ce travail a permis de découvrir des nouvelles séquences et d'isoler un nouveau micro-organisme producteur d'antibiotique(s).

Mots Clés : *Non-Ribosomal Peptides Synthétases, Colistine, Polymyxine, Paenibacillus, Mucoviscidose, Antibiotique, Peptides antimicrobiens.*

Abstract

Colistin is a cationic cyclic polypeptide antibiotic belonging to the polymyxin family and targeting bacterial membranes. It is produced by *Paenibacillus polymyxa* through a Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) mechanism. In the context of cystic fibrosis (CF), colistin is used for the treatment of lung infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*. Unfortunately, this molecule is also known for its strong side effects. So far, genetic systems controlling the production of polymyxins were little known. In this study we characterized by High-resolution LC-MS the antimicrobial molecules, including colistins, of a new *Paenibacillus*. A genomic library of this strain was constructed and screened to identify genes involved in the production of these antibiotics. A degenerated PCR screening was performed and allowed to select four clones in the genomic library. *In silico* study allowed to identify a new NRPS gene cluster responsible for the biosynthesis of colistin variants. In the future, this work might allow the harnessing of the production of colistin derived structures, more active and/or showing fewer side effects. In parallel, a second investigation was performed in order to find new NRPS genes in a collection of one hundred intertidal mudflat bacterial isolates. This work has allowed the identification of new sequences and the characterization of a new antimicrobial producing strain.

Key Words : *Nonribosomal Peptide Synthetase, Colistin, Polymyxin, Paenibacillus, Cystic Fibrosis, Antibiotic, Antimicrobial peptides.*